

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation des effets et des récepteurs de l'endothéline dans  
la vasculature utérine lors de la gestation chez la rate**

Par

Pascale Guérin

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) Pharmacologie

Décembre 2006

© Pascale Guérin, 2006



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation des effets et des récepteurs de l'endothéline dans la  
vasculature utérine lors de la gestation chez la rate

Présenté par :  
Pascale Guérin

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing :	Présidente-rapporteuse
Dr Jean St-Louis :	Directeur de recherche
Dr Gaétan Thibault :	Membre du jury

## RÉSUMÉ

Pendant la gestation, la circulation utérine est l'objet d'importantes modifications structurelles et fonctionnelles pour mener à bien le développement fœtal. Nous avons démontré que les artères utérines arquées doublent leur diamètre et voient leur réactivité aux agents vasoconstricteurs augmenter. Des études récentes semblent démontrer une augmentation de la production de l'endothéline (ET) pendant la grossesse. Ainsi, nous nous interrogeons sur l'implication de l'ET dans le remodelage vasculaire utérin pendant la grossesse. Dans le but de caractériser les récepteurs de l'ET (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>) impliqués dans la réponse contractile de l'ET dans la circulation utérine de rates non-gestantes (Ng) et gestantes (G), nous avons mesuré, à l'aide de myographes pour microvaisseaux, les réponses contractiles des artères arquées utérines. Ces vaisseaux ont été soumis à une tension transmurale mimant une pression intraluminaire de 50 mm de Hg. Ils étaient exposés à différents analogues de l'ET, avec et sans antagonistes. Des immunobuvardages de type Western ainsi que de l'immunofluorescence ont été utilisés pour évaluer l'expression des récepteurs de l'ET. Les réponses maximales à l'ET-1 et à l'ET-3 sont augmentées dans les artères arquées des rates G comparativement aux Ng. De plus, l'ET-1 est plus puissante que l'ET-3 pour contracter les artères arquées utérines de rates Ng, mais les deux agonistes sont équipotents pendant la grossesse. Des réponses à la sarafotoxine 6c (S6c), un agoniste ET<sub>B</sub>, ont été obtenues uniquement dans les artères de rates G. Le BQ 123, un antagoniste ET<sub>A</sub>, inhibe fortement les réponses à l'ET-1 dans les artères arquées de rates Ng exclusivement. Le BQ 788, un antagoniste ET<sub>B</sub>, déplace significativement vers la droite la courbe dose-réponse à la S6c des artères de rates G. Bien que la combinaison des deux antagonistes sélectifs déplace vers la droite la courbe de contraction dans les deux groupes, le bosentan, un antagoniste non-sélectif, était plus efficace pour bloquer les contractions vasculaires. Durant la grossesse, la réponse à l'ET-1 est fortement réduite par la présence d'ibuprofène, un inhibiteur des cyclooxygénases. L'expression des récepteurs de l'ET a été mesurée par immunobuvardage de type Western et par immunofluorescence qui ont révélé une augmentation de l'expression des récepteurs ET<sub>B</sub> uniquement dans l'endothélium des artères utérines pendant la grossesse. Ces résultats suggèrent que les réponses contractiles à

l'ET impliquent le récepteur  $ET_A$  dans les artères arquées utérines de rates Ng, tandis que le récepteur  $ET_B$  serait aussi impliqué pendant la grossesse. De plus, les réponses à l'ET-1 impliquent partiellement la libération endogène de produits des cyclooxygénases (COX).

**Mots-clés:** endothéline, récepteur, grossesse, artère utérine, remodelage vasculaire, cyclooxygénase, rat, BQ123, BQ788, Bosentan, Ibuprofène.

## ABSTRACT

During pregnancy, uterine circulation undergoes important structural and functional modifications to help satisfy fetal requirements. For example, uterine blood vessels undertake major hypertrophy. Indeed, arcuate uterine arteries double their diameter and increase their reactivity to vasoconstrictor agents. Recent studies suggested increased production of endothelin (ET) during pregnancy. Therefore, we questioned the implication of ET in uterine vascular remodeling during pregnancy. To characterize ET receptor subtypes (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>) involved in the contractile response to ET in the uterine circulation of non pregnant (Np) and pregnant rats (Pg), we have measured, using wire myographs, its contractile responses of uterine arcuate arteries. Vessel segments were stretched to mimic a passive tension equivalent to 50 mm of Hg and were exposed to different effectors of ET receptors. Western blots and immunofluorescence were used to evaluate tissue expression of ET receptors. Maximal responses to ET-1 and ET-3 were increased in arcuate arteries of pregnant compared to Np rats. ET-1 was more powerful than ET-3 to contract arcuate uterine arteries of Np rats, while both agonists produced equipotent responses in arteries of Pg. Responses to sarafotoxin 6c (S6c), an ET<sub>B</sub> agonist, were only obtained in arteries of Pg rats. The ET<sub>A</sub> antagonist, BQ123, strongly inhibited ET-1 responses in arteries of Np rats exclusively. BQ 788, an ET<sub>B</sub> antagonist, significantly right shifted S6c response-curve of arteries of Pg rats. Combination of the two selective antagonists' right shifted ET-1 contraction curve in both groups while bosentan, a non selective ET receptor antagonist, was more potent in blocking the vascular contractions in uterine arcuate arteries. Response to ET-1 in arteries of Pg rats was importantly reduced in the presence of ibuprofen. Expression of ET receptors was measure by Western blot and immunofluorescence and reveal increased expression of only the ET<sub>B</sub> in the endothelial lining of the uterine arteries during pregnancy. These results suggest that contractile responses to ET are mediated by the ET<sub>A</sub> receptor in arcuate uterine arteries of Np rats, while the ET<sub>B</sub> receptors appear to be also involved during pregnancy. Furthermore, endogenous liberation of some cyclooxygenases (COX) products was observed to participate to ET-1

responses and expression of COX-2 was measure by Western blot and reveal increased expression during pregnancy.

**Key words:** endothelin, receptor, pregnancy, uterine artery, vascular remodeling, cyclooxygenase, rat, BQ123, BQ788, Bosentan, Ibuprofen.

## TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION DU MÉMOIRE	i
PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
 1. INTRODUCTION	 1
1.1. Composantes hémodynamiques de la grossesse	2
1.1.1. Modifications cardiovasculaires	2
1.1.2. Vaisseaux sanguins	6
1.1.2.1. Structure des vaisseaux	6
1.1.2.2. Circulation sanguine utérine	8
1.1.2.3. Remodelage durant la grossesse	12
1.1.2.4. Réactivité	12
1.1.3. Contexte clinique	13
1.2. Endothéline	15
1.2.1. Endothéline	15
1.2.2. Récepteurs	20
1.2.3. Agonistes et antagonistes	25
1.2.3.1. Agoniste (Sarafotoxine 6c)	25
1.2.3.2. Antagonistes (BQ123, BQ788 et Bosentan)	26
1.2.4. Implications pendant la grossesse	28
1.3. Cyclooxygénases	31



1.3.1.	Cyclooxygénase	31
1.3.2.	Mécanisme d'action	32
1.3.3.	Agent pharmacologique (Ibuprofen)	34
1.3.4.	Implications en grossesse	36
1.4.	Hypothèse de travail	38
2.	ARTICLE	39
3.	DISCUSSION	63
4.	BIBLIOGRAPHIE	71

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Pression artérielle moyenne chez la femme pendant la grossesse. (*traduite de Montquin*)(96)
- Figure 2.** Structure comparée des vaisseaux sanguins. (*tirée de Tortora*)(133)
- Figure 3.** Vascularisation de l'utérus, des trompes de Fallope et des ovaires chez la femme. (*traduite de Gabbe*)(48)
- Figure 4.** Organes et vaisseaux urogénitaux chez la rate. (*adaptée de Chiasson*)(19)
- Figure 5.** Structures primaires des endothélines. (*tirée de Jean-François Jasmin*)
- Figure 6.** Voie de synthèse de l'endothéline par les cellules endothéliales vasculaires. (*adaptée de Haynes*)(58)
- Figure 7.** Action vasculaire de l'endothéline.
- Figure 8.** Voies de signalisation activées par l'ET-1 pour induire la dépolarisation cellulaire, la vasoconstriction, la prolifération/remodelage et la réactivité vasculaire. (*tirée et traduite de Motte*)(95)
- Figure 9.** Voies de synthèse des prostanoïdes. (*traduite et adaptée de Warner*)(141)
- Figure 10.** Site d'action d'un anti-inflammatoire non-stéroïdien. (*traduite de Rang, Dale, Ritter et Moore*)(109)

**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** Antagonistes et agonistes des récepteurs de l'endothéline selon leur sélectivité.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>AINS</b>	: Anti-inflammatoire non-stéroïdien
<b>AMP<sub>c</sub></b>	: Adénosine monophosphate cyclique
<b>Ang II</b>	: Angiotensine II
<b>ARN<sub>m</sub></b>	: Acide ribonucléique messenger
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Calcium
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Chlorure de calcium
<b>COX</b>	: Cyclooxygénase
<b>DAG</b>	: Diacylglycérol
<b>ECE</b>	: Enzyme de conversion de l'endothéline
<b>EDHF</b>	: Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
<b>EGF</b>	: Facteur de croissance épidermique
<b>ET</b>	: Endothéline
<b>ETR</b>	: Récepteurs de l'endothéline
<b>FGF</b>	: Facteur de croissance fibroblastique
<b>G</b>	: Gestante
<b>GMP<sub>c</sub></b>	: Guanosine monophosphate cyclique
<b>GC</b>	: Guanylate cyclase
<b>Hg</b>	: Mercure
<b>IP<sub>3</sub></b>	: Inositol triphosphate
<b>kb</b>	: kilobase
<b>KBS</b>	: Solution Krebs bicarbonate
<b>KCl</b>	: Chlorure de potassium
<b>kDa</b>	: kilodalton
<b>L</b>	: Litre
<b>MAPK</b>	: Protéine kinase activée par des agents mitogènes
<b>mg</b>	: milligramme

<b>mm</b>	: millimètre
<b>mM</b>	: millimolaire
<b>mN</b>	: millinewton
<b>Na<sup>2+</sup></b>	: Sodium
<b>NaCl</b>	: Chlorure de sodium
<b>NG</b>	: Non gestante
<b>NO</b>	: Monoxyde d'azote
<b>OCT</b>	: <i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
<b>PDGF</b>	: Facteurs de croissance dérivés des plaquettes
<b>PG</b>	: Prostaglandine
<b>PhE</b>	: Phényléphrine
<b>PKC</b>	: Protéine kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	: Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	: Phospholipase C
<b>PPAR</b>	: Récepteur activé par les péroxisomes activateurs
<b>RT-PCR</b>	: Réaction de polymérase en chaîne précédée d'une transcription inverse
<b>S6c</b>	: Sarafotoxine c
<b>SDS</b>	: Dodécyl sulfate de sodium
<b>SRAA</b>	: Système rénine-angiotensine-aldostérone
<b>TXA<sub>2</sub></b>	: Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>µm</b>	: micromètre
<b>µmol</b>	: micromole
<b>nmol</b>	: nanomole

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres de ma famille pour leur présence et leurs constants encouragements tout au long de mon cheminement.

Un merci tout spécial à Michel pour m'avoir soutenu dans les moments où la foi me manquait et pour n'avoir jamais cessé de croire en moi. Merci également pour ton attention et ton écoute lors de mes questionnements ainsi que pour m'avoir incité à toujours repousser mes limites.

Je dédie un sincère remerciement à Jean, mon directeur de recherche et mentor, pour m'avoir transmis la passion de la recherche, le goût du savoir et surtout, pour me rappeler constamment d'où je viens!

Je remercie également Benoit Sicotte pour ses inestimables conseils techniques et son humour. Merci à mes amis et précieux compagnons de laboratoire : Pierre-André pour ta présence masculine au moment où j'en avais le plus besoin et Mylène pour être devenue une complice de tous les instants. Merci aussi à Karine, Rébecca, Véronique, Marie-Ève, Cindy, Étienne et Valéry pour votre aide, votre amitié et pour tous ces moments de purs plaisirs.

## **1. INTRODUCTION**

## **1.1. COMPOSANTES HÉMODYNAMIQUES DE LA GROSSESSE**

La grossesse normale, chez la femme, s'accompagne de plusieurs modifications anatomiques et physiologiques. Ces ajustements ont pour principal objectif de permettre la croissance de l'unité fœto-placentaire tout au long de la gestation. De plus, ces changements sont enclenchés au tout début de la grossesse, bien avant que les besoins du fœtus le nécessitent. Également, les changements physiologiques, surtout cardiovasculaires, sont réversible en *post-partum* ce qui fait de la grossesse une condition particulière et unique. Dépendamment de l'espèce, la durée de la grossesse varie. Chez la femme, la grossesse dure environ 39 semaines tandis que chez la rate elle est de 22 jours. Dans tous les cas, survient la naissance de bébés dont l'organogénèse est terminée, mais à des stades de développement variable.

### **1.1.1. Modifications cardiovasculaires**

Pendant la grossesse survient un accroissement de la volémie afin de permettre une perfusion et une oxygénation adéquate de l'utérus, du placenta et du fœtus. Chez la femme enceinte, le volume sanguin augmente d'environ 25% à 50% jusqu'à la 32<sup>ème</sup> semaine de grossesse <sup>10</sup> tandis que chez la rate, cette augmentation est de l'ordre de 20% au début de la 3<sup>ème</sup> semaine et atteint 40% juste avant la mise bas <sup>11, 12</sup>. L'expansion substantielle du volume circulant maternel est dû à une augmentation simultanée du volume plasmatique ainsi que de la masse globulaire <sup>3</sup>.

L'accroissement du volume plasmatique est provoqué en partie par une stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et, également, par une diminution de la résistance périphérique d'installation précoce durant la grossesse <sup>13, 14</sup>. Les connaissances actuelles ne nous permettent pas d'affirmer lequel de ces deux phénomènes est à l'origine de l'autre, mais montrent que la grossesse est une condition chronique de rétention hydrique et d'hypo-osmolarité <sup>15</sup>.



Pendant la deuxième moitié de la grossesse, il survient une augmentation de la masse globulaire de 20 à 30%, résultant de l'action de diverses hormones sur la synthèse d'érythropoïétine: l'hormone chorionique somato-mammotrophique, la prolactine et la progestérone <sup>16</sup>. Puisque l'augmentation du volume globulaire est inférieure à celle du volume plasmatique, les femmes enceintes sont sujettes à développer une anémie physiologique de grossesse <sup>17</sup>. Cette anémie de dilution a pour conséquence une diminution du transport d'oxygène compensée par une hyperventilation ainsi que par une déviation vers la droite de la courbe de dissociation de l'hémoglobine ce qui accroît l'extraction tissulaire de l'oxygène. De plus, afin de maximiser les chances de survie du fœtus, l'hémoglobine fœtale a une plus grande affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine maternelle <sup>18</sup>. Cette préférence favorise ainsi l'extraction de l'oxygène au profit du fœtus tout en exacerbant l'anémie maternelle.

En réponse à cette augmentation de la volémie, le cœur doit modifier sa morphologie. Il a été rapporté que l'augmentation du volume télédiastolique des cavités cardiaques produit un épaississement de la paroi du ventricule gauche. Cet épaississement est caractérisé par une hypertrophie concentrique modérée du myocarde semblable à celle retrouvée chez les sportifs <sup>19</sup>. De plus, il s'installe une dilatation des oreillettes droite et gauche et une augmentation des surfaces aortiques, pulmonaire et mitrale <sup>3</sup>.

Pendant la grossesse, le débit cardiaque augmente de près de 50% avec un gain de 1,5 L/min dès le premier trimestre. Cette augmentation se maintient jusqu'à l'accouchement où le débit moyen passe à 6L/min <sup>20</sup>. L'installation précoce d'une vasodilatation artérielle en tout début de grossesse expliquerait probablement l'augmentation du débit cardiaque. Vers la 24<sup>ème</sup> semaine de grossesse, le débit cardiaque atteint son maximum tandis que le volume sanguin continu d'augmenter <sup>21</sup>. L'augmentation du débit cardiaque permet l'accroissement du débit utéroplacentaire nécessaire à la croissance du fœtus. En effet, le débit sanguin utérin passe de 2% à

environ 17% du débit cardiaque à terme <sup>22</sup>. Chez le rat, le débit utérin augmente d'environ 70 fois pendant la gestation <sup>23</sup>. Toutefois, le débit sanguin utérin et, conséquemment, l'apport en nutriments et oxygène est vulnérable aux variations. Lorsque le débit cardiaque maternel diminue, le sang est redistribué au cœur et au cerveau ce qui a pour effet de détourner le débit sanguin de l'unité fœto-placentaire. De même, un changement de la pression sanguine peut engendrer une diminution de ce précieux apport à l'utérus.

Bien qu'il survienne une augmentation du débit cardiaque, la pression artérielle diminue pendant la grossesse. Ce phénomène n'est pas exclusif à la femme <sup>1</sup> et se manifeste aussi chez la rate <sup>24</sup>, mais à des moments différents. Chez la rate, cette diminution de pression s'amorce au milieu de la troisième et dernière semaine de gestation. Tandis que chez la femme, la chute de pression artérielle (environ 10%) apparaît au début du deuxième trimestre pour ensuite remonter vers la 32<sup>ème</sup> semaine jusqu'à l'accouchement <sup>25, 26</sup> (fig.1). La pression varie donc peu, malgré l'augmentation du débit cardiaque, en raison de l'importante diminution de la résistance périphérique. Également, la régulation de la pression artérielle est importante lors des changements de position. Ainsi, lors de la grossesse, la sensibilité des baroréflexes est accrue pour protéger les femmes contre les variations du débit cardiaque. En effet, on a observé une diminution de 10% du débit sanguin lors du positionnement en décubitus dorsal en raison d'une compression de la veine cave <sup>21</sup>.

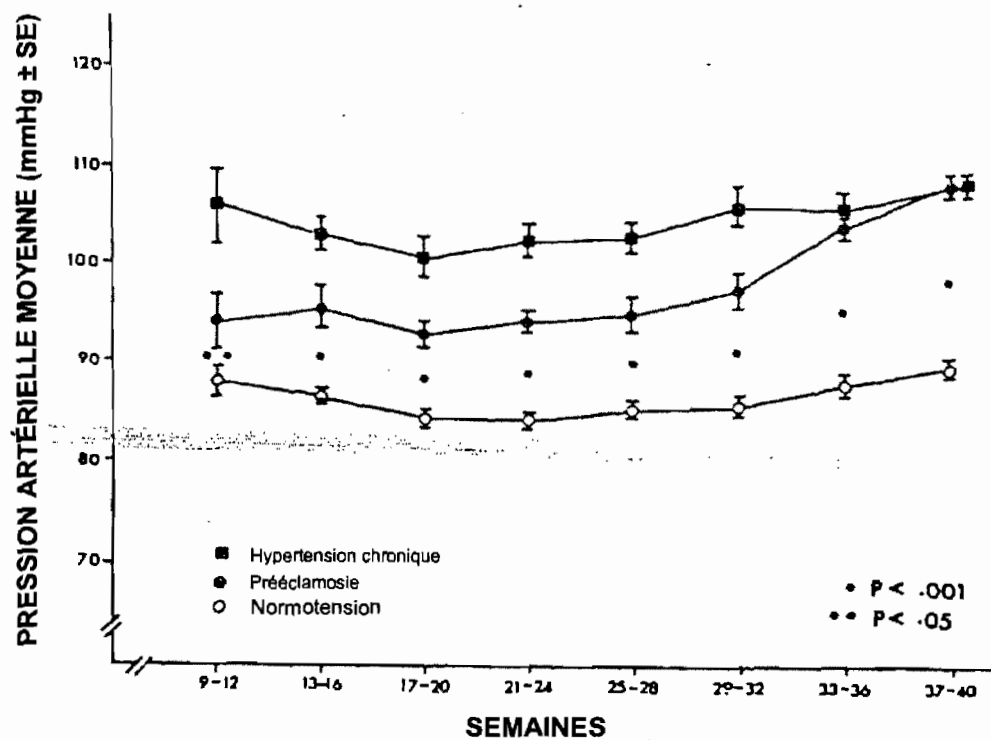


Figure 1: Pression artérielle moyenne chez la femme pendant la grossesse (*traduite de Moutquin*)<sup>1</sup>.

Le volume sanguin circulant supplémentaire, nécessaire lors de la grossesse, se répartit dans le système capacitif. En effet, il apparaît au cours de la grossesse une importante augmentation de la capacité veineuse. Celle-ci se manifeste par la création de plexus veineux, par la dilatation des gros troncs veineux et par l'accroissement des cavités cardiaques. Ainsi, en fin de grossesse, survient une accumulation de sang dans les membres inférieurs en raison de l'hyperpression veineuse et de l'extensibilité accrue des parois de ces vaisseaux. Toutes ces modifications ayant pour but de favoriser le remplissage cardiaque sans toutefois activer la sécrétion de facteurs natriurétiques auriculaires <sup>27</sup> et de minimiser les variations du retour veineux afin d'assurer un débit utéroplacentaire suffisant pour les besoins du fœtus. Également, les changements encourus par le système capacitif s'estompent rapidement après l'accouchement et le système retourne à son état initial non gravide <sup>14</sup>.

#### 1.1.2. Vaisseaux sanguins

##### 1.1.2.1. Structure des vaisseaux

Les vaisseaux sanguins forment un réseau fermé de conduit dynamique qui achemine le sang aux différents organes et qui le ramène au cœur. Les artères distribuent le sang qui sort du cœur et l'achemine aux organes et tissus cibles. Ce sont également les artères qui contrôlent l'hémodynamie puisqu'elles peuvent se contracter et se dilater afin de régler la vitesse de l'écoulement sanguin. Les artères sont composées de 3 couches distinctes, de la plus profonde à la plus superficielle : la tunique interne, la tunique moyenne et la tunique externe (fig. 2). La tunique interne, aussi appelé intima, est formée d'un épithélium simple pavimenteux appelé endothélium, d'une membrane basale et d'une couche de tissu élastique appelée limitante élastique interne. La couche du centre, la tunique moyenne, est habituellement la plus épaisse et est composée de fibres élastiques et de fibres musculaires lisses disposées en anneau autour de la lumière. La forte concentration en fibres élastiques des artères leur confère

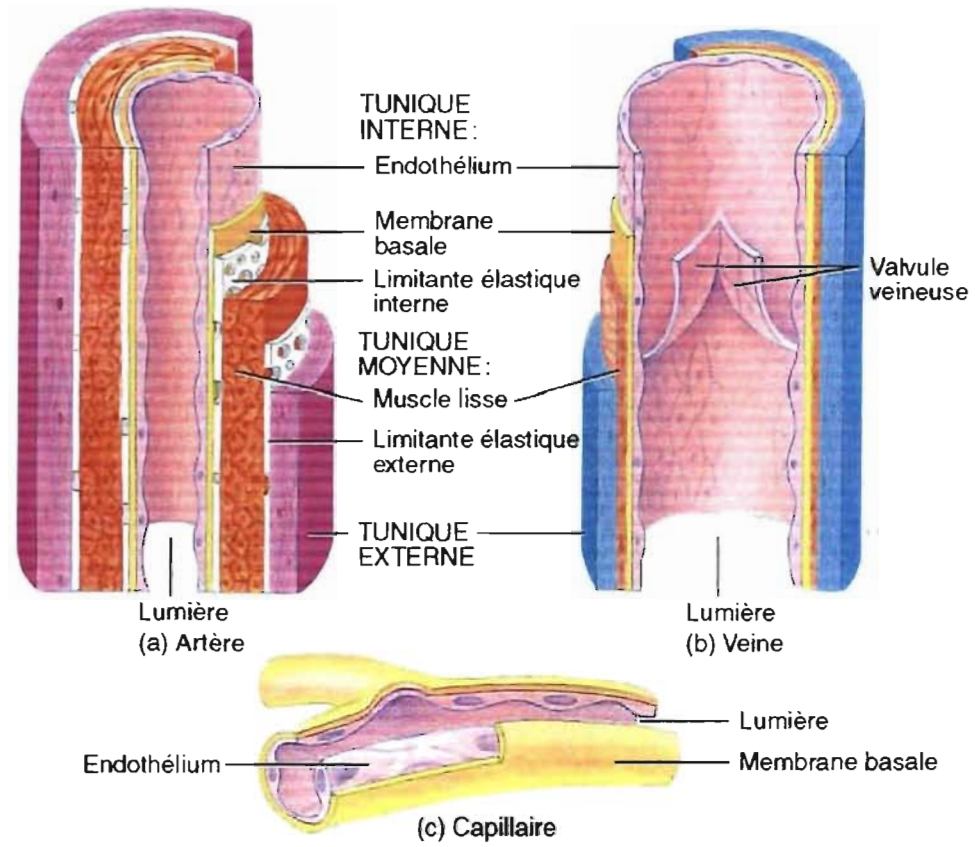
une grande compliance. En effet, ces fibres élastiques peuvent s'étirer jusqu'à 150% de leur longueur et reprendre leur forme initiale. L'enveloppe superficielle, la tunique externe, est essentiellement constituée de fibres élastiques et de fibres de collagène qui procurent à l'artère une certaine robustesse. Le rôle de chaque vaisseau dépend de sa localisation dans l'arbre vasculaire. De même, la proportion des différents constituants décrits ci-dessus varie en fonction du rôle et du calibre du vaisseau. Par exemple, les artères musculaires de l'utérus possèdent une tunique moyenne contenant plus de cellules musculaires lisses et moins de fibres élastiques que les artères élastiques, comme l'aorte. Leur plus grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation leur permet de régler la vitesse de l'écoulement du sang. Également, l'abondance des cellules musculaires donne à la paroi des artères musculaires une certaine épaisseur.

Les veines sont essentiellement constituées des mêmes trois tuniques que les artères, toutefois, l'épaisseur relative de chaque revêtement est différente. Les tuniques interne et moyenne des veines sont plus minces que celles des artères, tandis que la tunique externe est plus épaisse et contient une grande quantité de fibres élastiques et de collagène. La structure des veines leur permet de se dilater en fonction des variations de volume et de pression, mais elles ne sont pas faites pour supporter les pressions élevées. Par ailleurs, la lumière des veines est plus importante que celle des artères correspondantes. Plusieurs veines possèdent des valvules veineuses qui sont de minces replis de la tunique interne. Ces replis forment des cuspides qui font saillie dans la lumière veineuse en direction du cœur et de cette façon empêchent la circulation sanguine rétrograde. Le retour veineux est le volume de sang qui retourne au cœur à partir des veines systémiques et dépend de deux paramètres. D'une part, le gradient de pression entre les veinules (environ 16 mm Hg) et le ventricule droit (près de 0 mm Hg), puis de la contraction des muscles

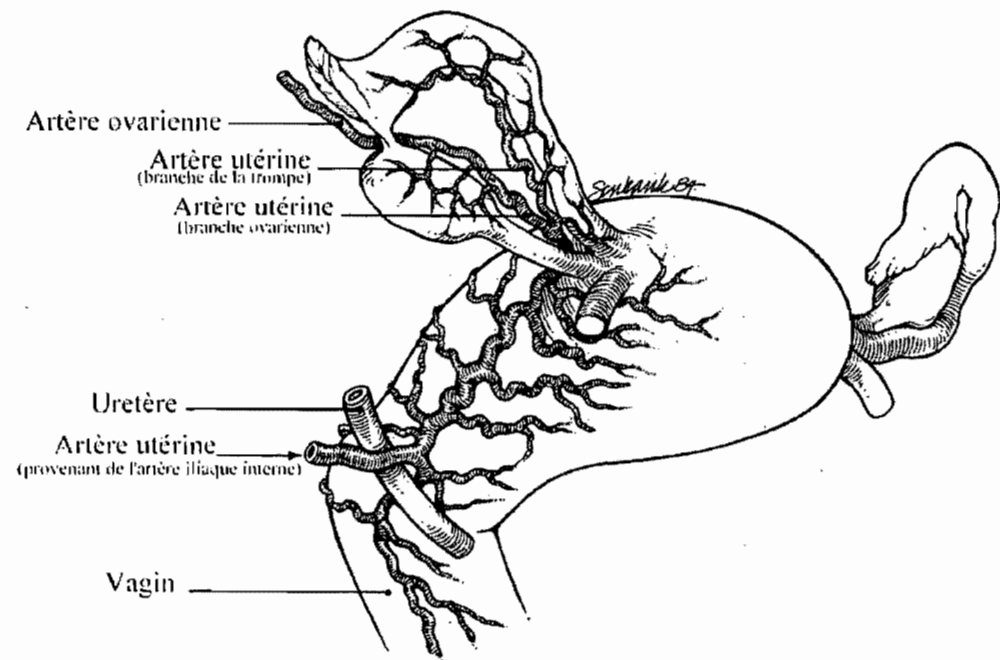
squelettiques dans les membres inférieurs et des changements de pression dans le thorax et l'abdomen pendant la respiration.

#### 1.1.2.2. Circulation sanguine utérine

Le sang de la mère atteint l'utérus par deux voies distinctes se rejoignant dans le myomètre (fig. 3). La première voie prend naissance dans l'artère iliaque commune pour ensuite se transformer en artère iliaque interne. De cette dernière, émerge l'artère utérine qui irrigue la base de l'utérus. La deuxième voie, quant à elle, débute dans l'aorte abdominale. De celle-ci naît l'artère ovarienne qui après avoir irrigué les ovaires s'anastomose à l'artère utérine dans la partie supérieure de l'utérus. L'artère utérine borde les parois latérales de l'utérus et forme des plexus laissant courir de nombreux vaisseaux perpendiculaires, les artères arquées. De ces artères arquées émergent des ramifications, les artères radiales, qui pénètrent dans le myomètre jusqu'à l'endomètre. Dans l'endomètre, les artères radiales donnent naissance aux artères spirales qui irriguent l'endothélium utérin et le placenta lors d'une grossesse. La circulation veineuse utérine suit parallèlement la vasculature artérielle. Chez la rate, la circulation est quel que peu différente (fig. 4). En effet, la majorité des vaisseaux (artères principales, arquées et radiales) sont extrinsèques à la paroi utérine. Cette différence morphologique facilite grandement la dissection et l'étude de ces vaisseaux ce qui fait de la rate un excellent outil de travail dans ce domaine scientifique.



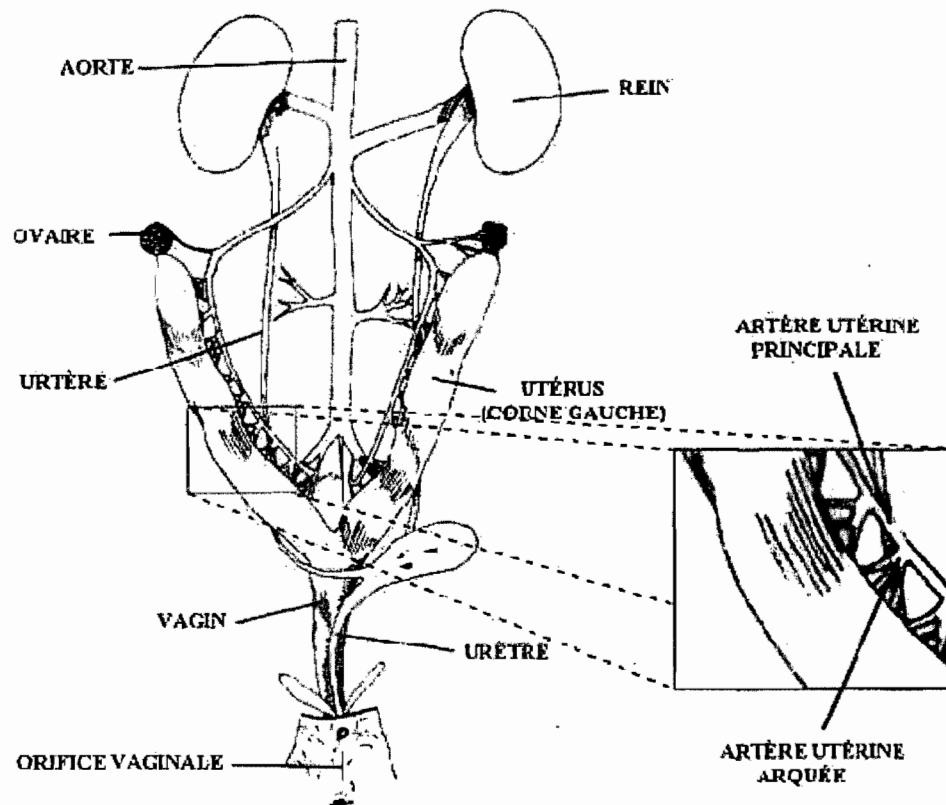
**Figure 2 :** Structure comparée des vaisseaux sanguin (*tirée de Tortora*) (133).



**Figure 3 :** Vascularisation de l'utérus, des trompes de Fallope et des ovaires chez la femme (*traduite de Gabbe*) (48).



Figure 4 : Organes et vaisseaux urogénitaux chez la rate (*adaptée de Chiasson*) (19).



### 1.1.2.3. Remodelage durant la grossesse

La vasculature utérine fait l'objet de changements pendant la grossesse dans le but d'augmenter le débit utérin. L'augmentation du débit sanguin est nécessaire afin de subvenir aux besoins grandissant du fœtus et d'éliminer les déchets qu'il produit. Chez le rat, le remodelage vasculaire est caractérisé à la fois par une hypertrophie et une hyperplasie de toutes les composantes de la paroi des vaisseaux <sup>28</sup>. Le diamètre des artères utérines double pendant la gestation et reprend sa dimension originale en *post-partum*. Pendant la grossesse, la résistance à l'étirement de ces vaisseaux est également accentuée et revient à la normale après la mise bas <sup>29</sup>. Effectivement, on note, pendant la grossesse, une augmentation de la tension passive dans la paroi de l'artère arquée utérine au fur et à mesure que la circonférence du vaisseau s'accroît. Le remodelage affecte aussi les veines utérines qui voient leur diamètre presque doubler en fin de gestation. La compliance des veines est également augmentée des suites d'une réduction du contenu en élastine de la paroi veineuse <sup>30</sup>. De plus, on remarque une augmentation de la prolifération cellulaire marquée par une élévation de l'indice mitotique des cellules endothéliales et musculaires <sup>31</sup>.

### 1.1.2.4. Réactivité

La grossesse est accompagnée d'une multitude de changements hémodynamiques incluant une résistance systémique aux effets de différents vasoconstricteurs. La réponse vasculaire *in vivo* et *in vitro* sur les artères systémiques (aorte, mésentérique, etc.) de rates gestantes montrent une réponse diminuée aux agents vasopresseurs comme l'angiotensine II (Ang II), la vasopressine et la phényléphrine (PhE) <sup>32</sup>. Chez la femme ce phénomène est appelé la résistance de la gestation aux effets vasoconstricteurs. Cette résistance serait probablement un facteur déterminant de la chute de pression sanguine survenant pendant la grossesse. Bien que les artères systémiques montrent une diminution de réactivité aux vasoconstricteurs durant la gestation, les artères

utérines répondent plus intensément à l'Ang II, la PhE et le KCl <sup>29</sup>. Par ailleurs, tous ces changements de réactivité retournent à la normale progressivement pendant le *post-partum*.

### 1.1.3. Contexte clinique

L'efficacité avec laquelle les vaisseaux s'adaptent à l'augmentation de la demande nutritionnelle fœtale définit la différence entre une fonction normale et des mécanismes pathologiques. Plusieurs données, provenant d'études animales, suggèrent qu'une diminution de la perfusion de l'utérus pendant la grossesse affecte le placenta et le fœtus <sup>33, 34</sup>. Une étroite corrélation entre le poids fœtal et l'augmentation du volume sanguin confirme l'influence du placenta comme shunt artériel dans la circulation maternelle. La ligature de l'artère utérine chez la rate gestante a permis d'observer que les fœtus situés près de cette constriction souffraient de restriction de croissance intrautérine <sup>34</sup>. De plus, le poids des placentas et des fœtus est plus faible chez les animaux (souris, cochon d'Inde et lapin) situés au centre des cornes utérines, là où la perfusion est la plus faible <sup>33</sup>. Chez la femme, c'est l'insuffisance vasculaire maternelle qui serait fortement associée (dans 25% à 30% des cas) à la restriction de croissance intrautérine <sup>35</sup>. Les chercheurs soupçonnent qu'une dysfonction endothéliale serait à l'origine d'un débalancement entre les facteurs relaxants et constricteurs dérivés de l'endothélium. Plus précisément, elle résulterait en une augmentation de la formation d'ET, de TXA<sub>2</sub> et de superoxyde, augmenterait la sensibilité vasculaire à l'Ang II et diminuerait la formation de vasodilatateurs comme le NO et la PGI<sub>2</sub> <sup>36</sup>. La réduction de la pression de perfusion utéroplacentaire et l'ischémie occasionnées par une augmentation de la constriction vasculaire utérine pourrait engendrer une augmentation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle <sup>37</sup>. Des études tentent de montrer que la diminution de l'invasion du cytotrophoblaste de la deciduas ainsi que le remodelage inadéquat des artères spiralées

constituerait le point de départ de l'augmentation de résistance vasculaire observée pendant la prééclampsie et la restriction de croissance utérine <sup>38, 39</sup>.

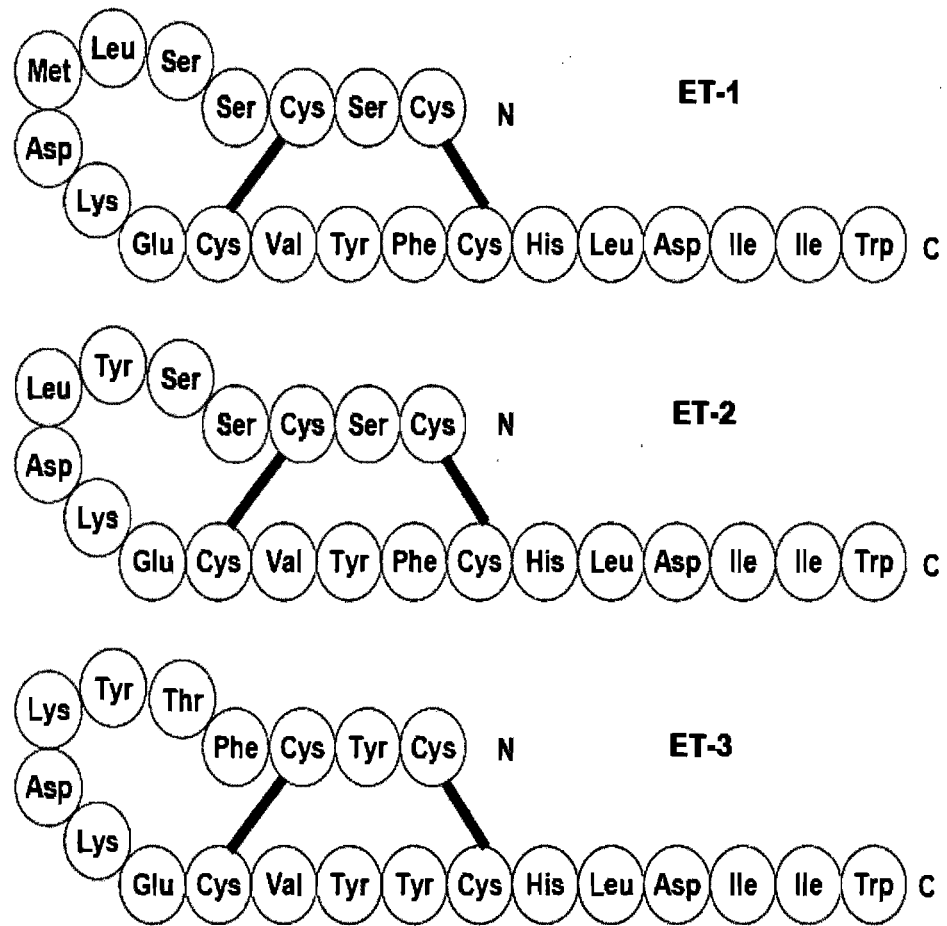
## 1.2. ENDOTHÉLINE

### 1.2.1. Endothéline

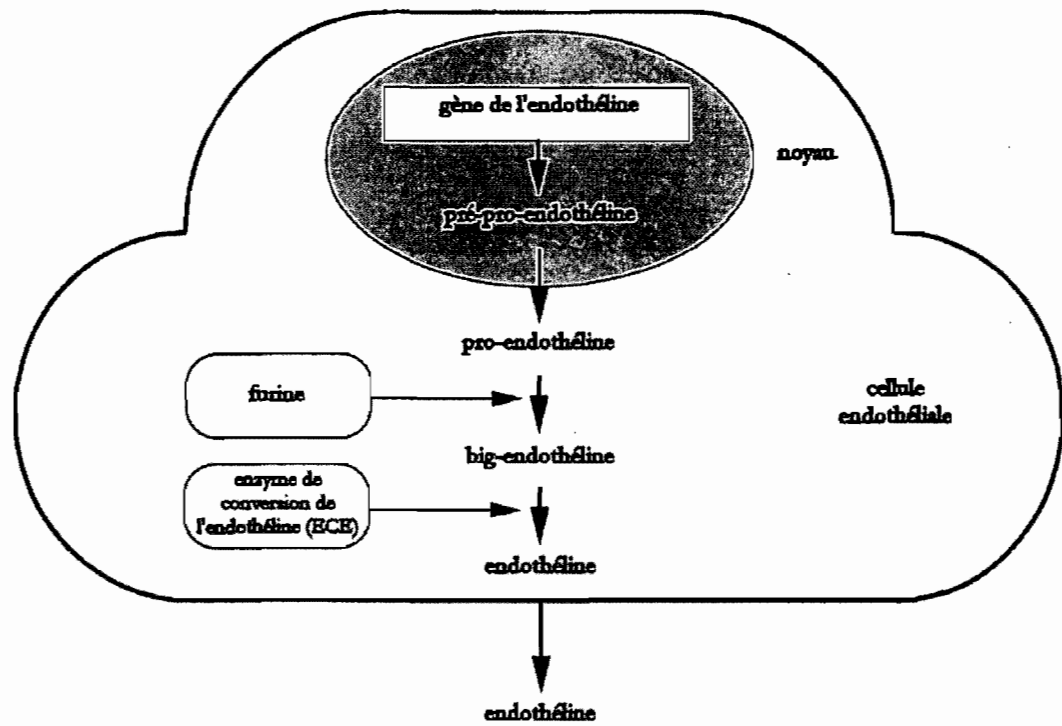
Les endothélines sont des vasoconstricteurs peptidiques de 21 acides aminés synthétisés dans l'endothélium vasculaire. Ces peptides ont une structure de boucle fermée par deux ponts disulfures. La découverte de l'endothéline-1, dans les années 80, a suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. En effet, Yanagisawa a réussi à isoler, à partir d'aorte porcine, un facteur peptidique ayant des propriétés vasoconstrictrices importantes <sup>40</sup>. À l'époque, l'endothéline-1 n'appartenait à aucune autre famille de peptide connue, mais présentait des homologues avec des groupes de neurotoxines agissant sur des canaux sodiques dépendant du voltage. Des études subséquentes ont permis d'identifier deux isoformes de l'ET-1 soit l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3) (fig. 5). Chacun de ces trois peptides est le produit de gènes différents, localisés sur les chromosomes 6, 1 et 20 respectivement <sup>41</sup>. L'ET-1 est reconnue comme étant l'isoforme prédominant dans la physiologie et la pathophysiologie cardiaque <sup>7</sup>. L'endothéline-1 est d'abord produite sous forme de prépro-peptide par les cellules endothéliales. Après le retrait du peptide signal, elle devient la pro-endothéline. L'étape suivante, consiste en la transformation de la pro-endothéline en big-endothéline par une endopeptidase de la famille des subtilisines, appelé furine <sup>42</sup>. Il a été démontré, dans les cellules endothéliales d'aortes bovines, que cette endopeptidase est présente de façon constitutive <sup>43</sup>. De plus, le clivage de la pro-endothéline par cette protéase est une étape essentielle au processus enzymatique suivant menant à la big-endothéline <sup>44</sup>. L'endothéline-1 mature est finalement obtenue à partir d'un clivage protéolytique de la big-endothéline par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et finalement sécrété par les cellules endothéliales (fig 6). Cette dernière conversion est physiologiquement importante puisque l'ET-1 est un vasoconstricteur 140 fois plus puissant que la big-endothéline <sup>45</sup>. Actuellement, trois isoformes de l'ECE ont été identifiées : ECE-1, ECE-2 et ECE-3. ECE-1 est exprimée

de façon ubiquitaire dans l'endothélium des poumons, des ovaires, des testicules et de la medulla de la surrénale. Quant à l'ECE-2, elle se retrouve essentiellement dans les tissus neuronaux <sup>46</sup>. Ce n'est qu'environ 5 ans après le clonage de l'ECE-1 que l'existence de l'ECE-3 a été démontrée dans l'iris de bœuf <sup>47</sup>.

L'endothéline-1 est transporté du réticulum endoplasmique à la membrane des cellules endothéliales via deux voies de sécrétion différentes. La voie constitutive implique une sécrétion continue, tandis que la voie contrôlée sous-entend une stimulation. La genèse d'endothéline est augmentée par des hormones, des facteurs de croissance, l'hypoxie, les forces de cisaillement, les lipoprotéines, les radicaux libres, les endotoxines et les cyclosporines <sup>6</sup>. La première voie est limitée au niveau de l'ARN<sub>m</sub> et a été proposée suite à des études sur des cellules endothéliales de porc <sup>40</sup>. La libération continue d'endothéline-1 par les cellules endothéliales produit une vasoconstriction intense des cellules musculaires lisses sous-jacentes et contribue au maintien du tonus vasculaire. Effectivement, la vasodilatation des vaisseaux de l'avant-bras, mesurée par l'augmentation du débit sanguin, a été observé lors de l'infusion de phosphoramidon (inhibiteur de l'ECE) et de BQ123 (antagoniste ET<sub>A</sub>) dans l'artère brachiale de sujets sains <sup>48</sup>. Également, l'endothéline-1 est libérée à partir de granules de sécrétion appelées corps de Weibel-Palade nommés ainsi en l'honneur des chercheurs qui les ont identifiées en 1964 <sup>49</sup>. Il a été suggéré que ces granules pourraient servir de sites de réserve et de maturation de la big-endothéline en endothéline-1 <sup>50, 51</sup>. La libération d'endothéline-1 se fait, dans ce cas, en réponse à des stimuli physiologiques ou pathologiques produisant une vasoconstriction encore plus soutenue <sup>50</sup>. En effet, une étude avec des individus sains soumis à un stress thermique, consistant en l'immersion de l'avant-bras dans l'eau glacée, a montré une augmentation de la concentration d'endothéline-1 sanguine détectée dans les deux minutes suivant la stimulation <sup>52</sup>. Ainsi, en raison de la rapidité de détection de l'endothéline-1 dans le sang, le groupe de Fyhrquist a rejeté l'hypothèse de la synthèse



**Figure 5 :** Structure primaire des endothélines (*adaptée de Schiffrin*)



**Figure 6 :** Voie de synthèse de l'endothéline par les cellules endothéliales vasculaires (*adaptée de Haynes*) (58).



*de novo* et suggéré une relâche de réserves intracellulaires. La relâche d'endothéline-1 est unidirectionnelle et s'effectue toujours en direction de la couche de cellules musculaires lisses<sup>53</sup>. Cette observation est en accord avec l'hypothèse selon laquelle ce peptide modulerait la tonicité vasculaire par un effet paracrine (local) plutôt qu'une influence humoral (systémique). De plus, une autre action autocrine est attribuée à l'ET-1 soit la stimulation du récepteur ET<sub>B</sub> endothélial. Celle-ci contribue à la libération de monoxyde d'azote menant à la relaxation des cellules musculaires sous-jacentes via l'activation d'une guanylate cyclase (GC). Dans des conditions physiologiques normales, l'endothéline et le monoxyde d'azote sont libérés constitutivement par l'endothélium vasculaire et procurent un équilibre entre la vasoconstriction et la vasodilatation. Cependant, des lésions vasculaires compromettant l'intégrité des cellules endothéliales peuvent provoquer une réduction de la synthèse de monoxyde d'azote et une surproduction d'ET-1.

L'ET-1 est le seul membre de la famille des endothélines à être produite à la fois dans les cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire. L'ET-1 est soupçonnée être un joueur important dans les mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque, de l'hypertension artérielle<sup>54, 55</sup>, de l'hypertension pulmonaire<sup>56</sup> et de l'insuffisance rénale<sup>57, 58</sup>. Dans l'hypertension artérielle chez l'humain, l'augmentation de la concentration d'ET-1 est controversée. La raison de cette hétérogénéité est probablement occasionnée par le fait que l'ET-1 est sécrété majoritairement de façon paracrine, ainsi les niveaux plasmatiques ne représentent que des déversements dans la circulation et pas nécessairement le degré d'activation de la voie de l'endothéline. Effectivement, la clearance de l'ET-1 de la circulation est très rapide. Suite à une injection intraveineuse d'endothéline radioactive chez le rat, on a pu mesurer une demi-vie biologique de 1 min. tandis que les effets vasoconstricteurs ont perduré pendant près d'une heure<sup>59, 60</sup>. Le peu d'endothéline circulante est majoritairement retenu par les poumons<sup>61</sup>. La circulation pulmonaire a la capacité d'épurer l'endothéline de la circulation, un processus effectué par le

récepteur endothélial  $ET_B$  <sup>62</sup>. Un seul passage par les poumons permet d'extraire 50% de l'endothéline circulante <sup>63</sup>.

L'endothéline-2 est la moins étudiée de toutes les endothélines. Elle est présente dans les reins <sup>64</sup>, les intestins et le myocarde en plus d'être un vasoconstricteur efficace dans les artères et les veines <sup>65</sup>. Les cellules endothéliales ne synthétisent pas l'endothéline-3, bien que ce peptide soit détectable dans le plasma <sup>66</sup>, le cœur et le cerveau. L'importance de l'ET-3 réside dans le fait qu'elle est la seule molécule endogène à permettre la distinction entre les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . En effet, son affinité pour le récepteur  $ET_B$  est la même que l'ET-1, mais est quasi nulle pour le récepteur  $ET_A$ .

### 1.2.2. Récepteurs

Les récepteurs spécifiques de l'endothéline sont exprimés dans une grande quantité de tissus et contribuent au maintien du tonus vasculaire. Les gènes qui codent pour les récepteurs humains de l'endothéline ont été isolés et clonés au début des années 90 <sup>67</sup>. Les deux récepteurs, type A et B, sont des récepteurs à sept passages transmembranaires de 45-50 kilodaltons (kDa) <sup>68</sup> et sont couplés aux protéines G, plus précisément  $G_{q/11}$ . Les gènes d' $ET_A$  et  $ET_B$  humains possèdent seulement 59% d'homologie entre eux. En revanche,  $ET_A$  a seulement 9% de différence entre le gène de l'humain et le gène du rat, quant à  $ET_B$ , c'est 12% de différence. La stimulation des récepteurs de l'endothéline entraîne l'activation, via une protéine G, de la phospholipase C qui, ensuite, produit deux seconds messagers : l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). L' $IP_3$  mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG est responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC). Cette cascade intracellulaire provoque une contraction des muscles lisses ou la sécrétion de divers médiateurs par les cellules endothéliales vasculaires (fig. 7). Chez l'humain, le récepteur  $ET_A$  est présent sur les cellules musculaires

lisses vasculaires et est responsable de la vasoconstriction.  $ET_A$  répond aux trois différentes endothélines selon l'ordre de puissance suivant :  $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$  <sup>69</sup>. Des expériences avec des souris invalidées en récepteurs  $ET_A$  montrent que les animaux développent d'importantes malformations physiques. Ces résultats suggèrent que ce récepteur serait impliqué dans la croissance et le développement <sup>70</sup>. De plus, il est démontré que  $ET_A$  détient un rôle capital dans le maintien du tonus vasculaire et de la pression artérielle <sup>48</sup>. La régulation de la production du récepteur  $ET_A$  va généralement de pair avec celle de l'endothéline-1. Les facteurs de croissance épidermiques, l'AMPc et les œstrogènes induisent la synthèse du récepteur tandis que l'endothéline-2, l'endothéline-3, l'Ang II et les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) l'inhibent <sup>68</sup>.

$ET_B$  est le récepteur de l'endothéline prédominant dans le rein et le poumon. Le récepteur  $ET_B$  répond aux trois endothélines de façon équipotente <sup>69</sup>. Selon plusieurs études, l' $ET_B$  présent sur l'endothélium serait un récepteur de clairance de l'endothéline-1 dans la circulation sanguine. Ce rôle a été confirmé en établissant la corrélation nette entre l'élévation de l'endothéline plasmatique et l'administration d'antagonistes  $ET_B$ . Effectivement, il y a diminution, dose dépendante, de la clairance d'endothéline-1 lors du blocage du récepteur  $ET_B$  et une accumulation du peptide dans le plasma <sup>71</sup>. Comme  $ET_A$ , les récepteurs  $ET_B$  peuvent activer la voie de la phospholipase C. De plus, ce récepteur, présent sur les cellules endothéliales vasculaires, jouerait un rôle dans la relâche de facteurs relaxants dépendant de l'endothélium comme le monoxyde d'azote et la prostaglandine  $I_2$  <sup>72</sup>. Quant à sa contribution à la vasoconstriction, elle varierait dépendamment de l'espèce et du lit vasculaire. Dans certain vaisseau, comme la veine saphène <sup>73</sup> et jugulaire <sup>74</sup> du lapin ainsi que la vasculature rénale <sup>75</sup> du rat, c'est  $ET_B$  qui induit la vasoconstriction.

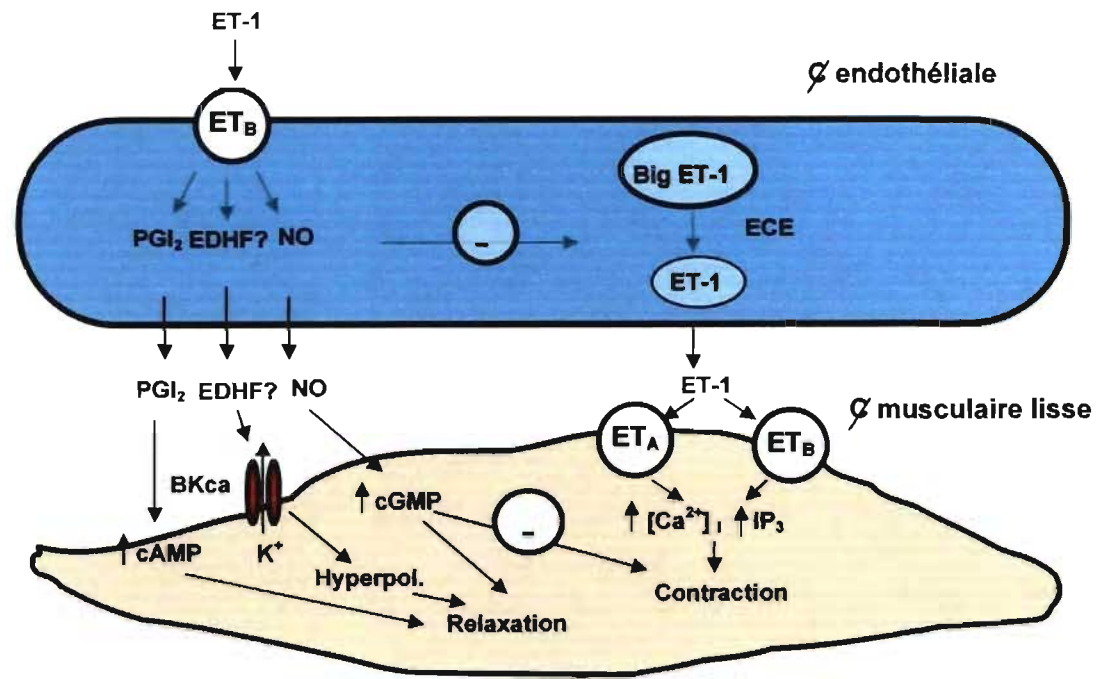
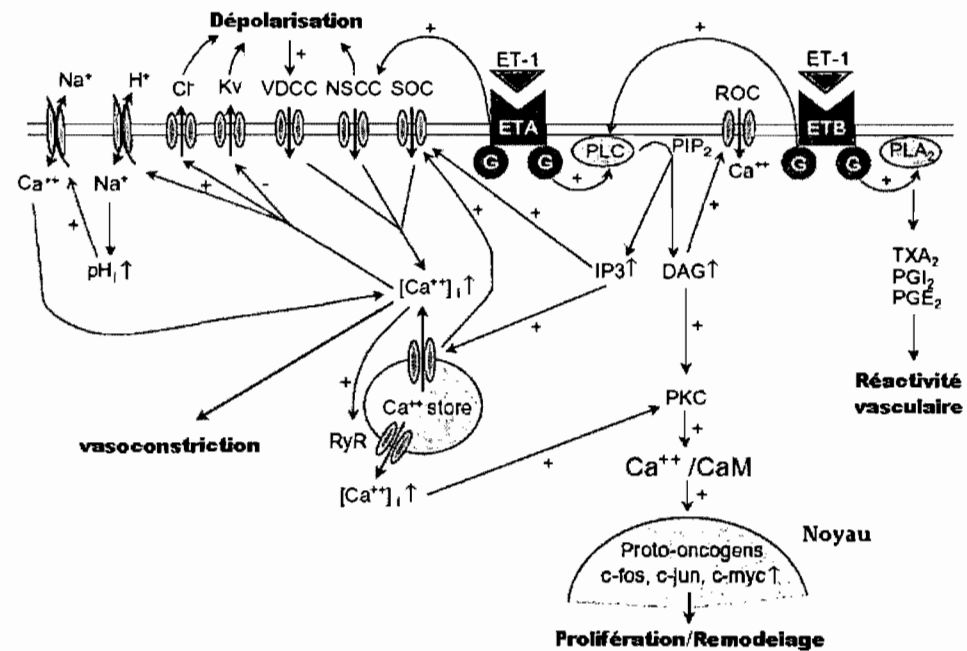


Figure 7 : Action vasculaire de l'endothéline-1.

Tandis que dans certain tissus, la contraction des muscles lisses vasculaires est possible par l'activation des deux récepteurs. Bien que les ET<sub>B</sub> de rat soient à 95% identiques à ceux de l'être humain, le BQ788 (antagoniste sélectif des récepteurs ET<sub>B</sub>) a une affinité différente pour les récepteurs des deux espèces. La différence d'affinité semble liée au fait que l'antagoniste se fixe sur des portions protéiques distinctes chez ces récepteurs. De plus, des études fonctionnelles suggèrent que le bloqueur non spécifique PD142893 peut bloquer l'action vasodilatatrice de l'ET-1 par le récepteur ET<sub>B</sub> endothélial et non l'action vasoconstrictrice de l'ET<sub>B</sub> musculaire <sup>76</sup>. Par contre, une étude de liaison n'a pu distinguer les récepteurs ET<sub>B</sub> exprimés dans les cellules endothéliales humaines des ET<sub>B</sub> présents sur les cellules musculaires lisses en culture <sup>77</sup>. En raison de cette controverse, l'International Union of Pharmacology maintient qu'il n'y a aucune justification pour d'autres types de récepteurs que l'ET<sub>A</sub> et l'ET<sub>B</sub> chez les mammifères. Un récepteur ET<sub>C</sub> est pourtant présent dans les cellules de plusieurs espèces, sauf l'humain, et est spécifique pour l'ET-3 <sup>78</sup>.

L'ET-1 active également une cascade de médiateurs induisant l'activation de la transcription de certains gènes (fig. 8). Ces voies de signalisation induisent des effets mitogéniques, hypertrophiques et de différenciation cellulaire <sup>7</sup> par l'activation de protéines tyrosines kinases par des voies protéine kinase C-indépendante et -dépendante. Ces médiateurs contribuent donc à la croissance cellulaire par l'induction de proto-oncogène *c-fos*, *c-myc* et *c-jun*, la voie des MAPK et la synthèse d'ADN <sup>79-81</sup>. Bien que ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> puissent stimuler la voie des MAPK, l'ET-1 induit plus efficacement cette voie dans les cellules musculaires lisses exprimant ET<sub>B</sub> <sup>82</sup>.



**Figure 8 :** Voies de signalisation activées par l'ET-1 pour induire la dépolarisation cellulaire, la vasoconstriction, la prolifération/remodelage et la réactivité vasculaire (tirée et traduite de Motte)(95).

### 1.2.3. Agonistes et antagonistes

Les ligands des récepteurs de l'endothéline, agonistes et antagonistes, sont majoritairement de nature peptidique. Il existe des agonistes et des antagonistes sélectifs pour l'un ou l'autre des deux récepteurs ainsi que les molécules non spécifiques. Contrairement aux molécules peptidiques, plusieurs antagonistes ET<sub>A</sub> sont non peptidiques et possèdent ainsi une biodisponibilité orale ce qui leur permet de traverser la barrière intestinale. La majorité de ces antagonistes sont plus puissants (pA<sub>2</sub> supérieur à 10 comparativement à 7 pour le BQ123), mais moins sélectifs et plus enclin à se lier dans le plasma.

#### 1.2.3.1. Agoniste (Sarafotoxine 6c)

La sarafotoxine 6c est l'un des agonistes ET<sub>B</sub> spécifique le plus utilisé en recherche. Ce composé est le seul peptide naturel avec un haut degré de similarité avec les endothélines. Cet homologue des endothélines est un peptide de 21 acides aminés provenant du venin d'un serpent, l'*Atractaspis engaddensis*, et permet l'identification de récepteurs ET<sub>B</sub> fonctionnels dans les muscles lisses vasculaires. La sarafotoxine 6c est 200 000 fois plus sélective pour ET<sub>B</sub> qu'ET<sub>A</sub> chez le rat <sup>83</sup>. Cependant, ce composé est moins spécifique chez l'humain révélant sans doute une différence du récepteur entre les espèces <sup>84</sup>. Des études montrent que cette toxine cause une vasodilatation dépendante de l'endothélium dans des préparations d'artères pulmonaires porcines. Ces résultats sont en accord avec le rôle d'ET<sub>B</sub> comme déclencheur de la relâche de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. Toutefois, contrairement aux endothélines, la sarafotoxine 6c peut activer des mécanismes intracellulaires dans le cervelet de rat via une voie qui n'impliquerait pas l'activation d'une protéine G<sub>q/11</sub>. Il est donc plausible de croire que la contraction des muscles lisses vasculaires provoquée par la sarafotoxine 6c implique l'activation de sites distincts de ceux connus <sup>85, 86</sup>. La sarafotoxine 6c a permis de démontrer

d'autres rôles du récepteur ET<sub>B</sub>. Parmi ceux-ci, l'augmentation de la sécrétion d'adrénomédulline par les cellules endothéliales canines stimulées à la sarafotoxine 6c. L'adrénomédulline est un peptide circulant possédant des propriétés vasodilatatrices et natriurétiques originaire de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaires lisses. Ainsi, les récepteurs ET<sub>B</sub> possèdent un rôle de régulation autocrine/paracrine du système vasoactif <sup>71</sup>.

#### 1.2.3.2. Antagonistes (BQ123, BQ788 et Bosentan)

Le BQ123 est un antagoniste spécifique des récepteurs ET<sub>A</sub> isolé du produit de la fermentation de *Streptomyces misakiensis*. Le BQ123 a rendu possible l'identification de récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans la paroi des artères coronaires de porc ainsi que la distribution des récepteurs ET<sub>A</sub> dans divers tissus <sup>87</sup>. Ce composé réduit de façon significative la pression artérielle chez le cobaye, supposant que les récepteurs ET<sub>A</sub> sont d'importants joueurs dans le maintien de la pression artérielle. De plus, l'administration de BQ123 dans les artères induit une importante vasodilatation dans l'avant-bras chez l'homme. Cette étude supporte un rôle du récepteur ET<sub>A</sub> dans le maintien du tonus vasculaire <sup>48</sup>.

Le nombre d'antagonistes ET<sub>B</sub> spécifiques est beaucoup plus restreint que les antagonistes ET<sub>A</sub> spécifiques, ce qui traduit clairement un manque d'intérêt clinique pour ce type de molécule. De plus, ils ont la mauvaise réputation d'être moins puissant et moins sélectif que les antagonistes du récepteur ET<sub>A</sub>. Le BQ788 est l'un des antagonistes ET<sub>B</sub> spécifiques fréquemment utilisé. *In vitro*, ce composé arrive à inhiber la liaison de l'ET-1 marqué à iode <sup>125</sup> avec les récepteurs ET<sub>B</sub> présents sur les cellules cardiaques humaines tout en inhibant que faiblement la liaison avec ET<sub>A</sub> dans des cellules neuroblastomiales humaines <sup>88</sup>. De même, dans l'aorte de rat, le BQ788 a inhibé la relâche de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. Cependant dans



l'aorte dénudée d'endothélium, le BQ788 n'a que légèrement atténué la contraction  $ET_A$  dépendante <sup>89</sup>. Chez le lapin, l'inhibition de la vasoconstriction dépendante d' $ET_B$  dans les artères pulmonaires nécessitent au moins 10  $\mu M$  de BQ788.

Le Bosentan est un antagoniste non peptidique des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . Ce médicament a été approuvé en décembre 2001 par la U.S. Food and Drug Administration dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Ce composé est hautement spécifique puisque des études de liaison avec 40 autres peptides, prostaglandines, ions et neurotransmetteurs ont montrées qu'il n'influçait pas la cinétique de ceux-ci. *In vitro*, le Bosentan entre en compétition avec ET-1 radioactive, pour les récepteurs  $ET_A$  des cellules musculaires lisses et les  $ET_B$  du placenta humain, et bloque efficacement le site de liaison <sup>90</sup>. D'autres expériences ont aussi montré que cette molécule empêchait la liaison de l'ET-1 et de la S6c aux deux récepteurs dans des aortes de rat et des trachées de porc. De plus, le Bosentan inhibe la relâche de facteurs relaxants dépendants de l'endothélium dans des artères mésentériques de lapin stimulées à la S6c <sup>90</sup>. L'administration de cet antagoniste à des animaux a clairement été associée à une diminution de la pression sanguine suggérant que l'effet global du blocage des récepteurs de l'endothéline est une vasodilatation <sup>91,92</sup>.

**Sélectivité pour les récepteurs**

ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>	ET <sub>A</sub> ET <sub>B</sub>
<b>Antagonistes</b>		
BQ123*	BQ788*	PD142893
BQ485	IRL1038	PD145065
BQ610		TAK-044
FR 139317		Bosentan*
PD155080		Ro462005
PD156707		L-754142
BMS182874		L-751281
A127722		SB209670
		SB217242
		Ro470203
		CP170687
		LU135252
<b>Agonistes</b>		
Aucun	[Ala <sup>1,3,11,15</sup> ]ET-1	ET-1*
	BQ3020	ET-2
	IRL1620	ET-3
	S6c*	

**Tableau 1.** Antagonistes et agonistes des récepteurs de l'endothéline selon leur sélectivité (\* composés utilisés dans l'étude).<sup>93,94</sup>

#### 1.2.4. Implications pendant la grossesse

De nos jours, très peu de choses sont connues concernant les signaux cellulaires et moléculaires initiant et perpétuant le remodelage et la croissance vasculaire de l'utérus pendant la grossesse. Des évidences semblent montrer que ces signaux proviennent de l'utérus même. Effectivement, on peut observer que lors d'une grossesse survenant dans une seule corne utérine chez la rate, l'autre corne ne montre aucune modification et garde son aspect non gravide. Également, lorsqu'une seule implantation survient dans la corne utérine, on peut observer une augmentation de la croissance vasculaire au pourtour du placenta tandis que le reste de la vasculature préserve l'apparence d'un utérus de rate non-gestante. Ces observations suggèrent que la croissance et le remodelage des vaisseaux utérins sont sous contrôle local et sont régulés par un ou des médiateurs humoraux d'origine fœtoplacentaire. Plusieurs raisons poussent les chercheurs à croire que l'ET serait un joueur important dans ce remodelage. En effet, l'ET est un important activateur de l'activité mitotique, de l'hypertrophie et de la différenciation cellulaire <sup>80, 81</sup> nécessaire à l'implantation et au développement du placenta. De plus, plusieurs médiateurs induisant une augmentation de la synthèse d'ET et de ses récepteurs sont augmentés pendant la grossesse : œstrogènes <sup>95</sup>, Ang II <sup>96</sup>, etc.

Les récepteurs de l'endothéline ont été détectés dans la vasculature fœtoplacentaire <sup>97, 98</sup> et l'ET-1 est un peptide vasoactif efficace dans les artères spiralées considérées comme un site majeur de contrôle de la résistance vasculaire placentaire <sup>99</sup>. Les vaisseaux placentaires humain présenteraient une prédominance de récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux ce qui démontrait l'importance de la dilatation et du maintien de la circulation fœtoplacentaire pendant la gestation <sup>100</sup>. Ainsi, l'endothéline-1 synthétisé dans le placenta pourrait contrôler l'hémodynamie fœtoplacentaire. Dans plusieurs cas de grossesses compliquées

d'une restriction de croissance intrautérine, le débit sanguin dans l'artère ombilicale est anormal, indiquant une augmentation de la résistance vasculaire dans l'unité fœtoplacentaire <sup>101</sup>. Cette pathologie est associée de surcroît à l'hypoxie fœtale <sup>102</sup>, incluant l'hypertrophie des gros vaisseaux, l'embolisation et l'oblitération des petits vaisseaux ainsi qu'à des lésions ischémiques <sup>103, 104</sup>. Dans ces situations, la production d'endothéline-1 est fortement accentuée et contribue certainement en partie à l'hémodynamie fœtoplacentaire pathologique <sup>105-108</sup>. Il est aussi supposé que l'ET-1 potentialiserait l'action d'autres vasoconstricteurs aggravant cette maladie <sup>109, 110</sup>.

Il semble également que l'ET-1 possèderait une importance lors de l'accouchement. En effet, l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans l'utérus chez la femme suit un dessin très précis. On a observé que le gène du récepteur ET<sub>A</sub> était exprimé préférentiellement dans la portion haute de l'utérus humain privilégiant ainsi une fonction constrictrice. L'accroissement de l'expression du récepteur s'effectue pendant les dernières semaines de la grossesse indiquant l'importance de celui-ci pour contribuer aux contractions. La portion inférieure, quant à elle, privilégierait l'expression du gène d'ET<sub>B</sub> favorisant une dilatation <sup>111</sup>.

### 1.3. CYCLOOXYGÉNASES

#### 1.3.1. Cyclooxygénases

Dans les gros vaisseaux, il a été démontré que l'endothéline stimulait la libération de substances vasoactives incluant des prostanoïdes comme la prostaglandine  $E_2$ , la prostaglandine  $I_2$  et la thromboxane  $A_2$  <sup>112, 113</sup>. De plus, le prétraitement de microvaisseaux cérébraux avec un inhibiteur des cyclooxygénases inhibe, non seulement la vasodilatation, mais aussi la vasoconstriction suggérant que les prostanoïdes sont responsables d'une partie des effets de l'endothéline dans la microvasculature <sup>114</sup>. L'endothéline active aussi la phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) dans les cellules musculaires lisses en culture menant à la relâche d'acides arachidoniques provenant des phospholipides membranaires <sup>115</sup>. L'acide arachidonique est ensuite métabolisé en prostaglandines, thromboxanes et leukotriènes dépendamment de la nécessité de la cellule.

Les cyclooxygénases, aussi nommé prostaglandine H synthases, ont été identifiées par John Vane en 1970 ce qui lui a valu, avec la découverte du  $PGI_2$ , un prix Nobel en 1982. La COX-1 et la COX-2 sont les enzymes responsables de la production des prostaglandines  $H_2$ , la première étape de la biosynthèse des prostanoïdes. Il est suggéré que la COX-1 soit responsable pour la production physiologique de prostanoïdes et la COX-2 pour la production élevée survenant lors d'un processus inflammatoire. C'est pour cette raison que la COX-2 est une cible privilégiée des effets anti-inflammatoires des AINS. Les gènes codants pour la COX-1 et la COX-2 sont localisés sur les chromosomes 9 et 1 respectivement. Le gène de la COX-1 totalise 22 kilobases (kb) et celui de la COX-2, plus court, fait 8,3 kb <sup>116</sup>. Contrairement à la COX-1, la COX-2 possède de nombreux sites de régulation. *In vivo*, l'augmentation de la COX-2 est associée avec l'inflammation, l'arthrite rhumatoïde, les lésions et l'ischémie. Les voies intracellulaires contrôlant ces événements sont nombreuses et complexes puisqu'elles

varient en fonction du type cellulaire et du stimulus. Récemment, des chercheurs ont proposé que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  pourrait être un joueur important dans la régulation de la COX-2 <sup>117, 118</sup>. La régulation de la COX-2 est aussi post-transcriptionnelle. En effet, *Ras* (oncogène impliqué dans le cancer) provoque via la protéine kinase B <sup>119</sup> la stabilisation de l'ARN<sub>m</sub> de la COX-2 <sup>120</sup>.

### 1.3.2. Mécanisme d'action

La première étape dans la formation des prostaglandines est la libération du substrat, l'acide arachidonique, de la membrane de phospholipides. Cette action est catalysée par la phospholipase A<sub>2</sub> (fig.9). La phospholipase A<sub>2</sub> est exprimée de façon constitutive et inductive ainsi que sous différents isoformes. Cependant, c'est la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique d'une taille de 85 kDa qui catalyse le plus souvent cette réaction. L'activation de cet isoforme nécessite du calcium et de la calmoduline. C'est pourquoi on a longtemps cru que c'était la phospholipase, et non les COX, l'étape limitante de la production des prostaglandines <sup>121</sup>. Une fois l'acide arachidonique libérée, les deux isoformes de COX génèrent la PGG<sub>2</sub> et la PGH<sub>2</sub> par le biais de processus enzymatique semblable. Ensuite, la PGH<sub>2</sub> est métabolisée par différentes enzymes en une foule de produits aux vastes effets biologiques. Les effets des prostanoïdes relâchés dans la circulation sont engendrés par des récepteurs des prostaglandines sur les cellules et les tissus cibles. Ces récepteurs sont des molécules à sept passages transmembranaires. On distingue pharmacologiquement cinq groupes : DP pour la PGD<sub>2</sub>, EP pour la PGE<sub>2</sub>, FP pour la PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , IP pour la PGI<sub>2</sub> et TP pour le TXA<sub>2</sub>.

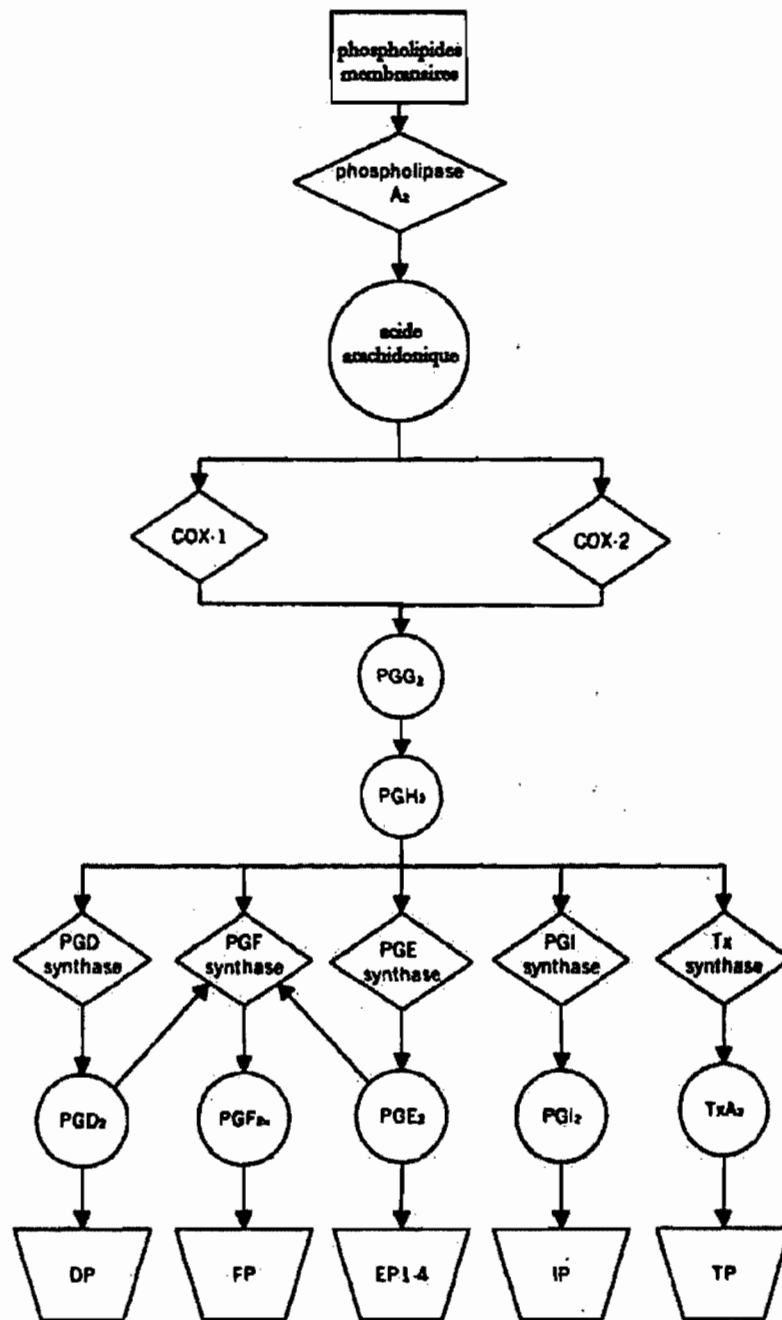


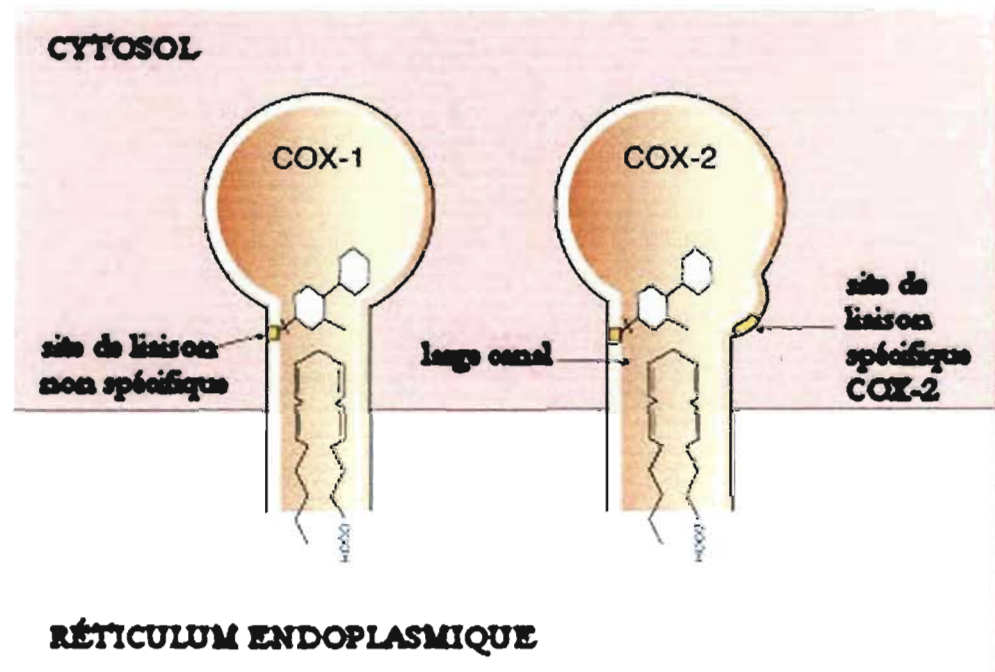
Figure 9 : Voies de synthèse des prostanoïdes (traduite et adaptée de Warner)<sup>8</sup>.

Les cyclooxygénases possèdent une double action enzymatique : une fonction peroxydase et une fonction oxygénase. La première réaction enzymatique est la cyclooxygénation qui donne le  $\text{PGG}_2$  et la deuxième, la peroxydation qui convertit le  $\text{PGG}_2$  en  $\text{PGH}_2$ . La COX-1 et la COX-2 sont associées avec la membrane et chacune consiste en un canal courbé à l'extrémité. Le canal de la COX-2 est significativement plus large que celui de la COX-1 et c'est cette particularité qui confère la spécificité des bloqueurs de COX-2 (fig. 10). L'ouverture de ce canal est très hydrophobe. L'acide arachidonique entre dans le canal et se positionne de façon à permettre l'insertion de deux molécules d'oxygène et l'extraction d'un radical libre. Ceci résulte en la formation d'un composé à un anneau de cinq carbones, structure caractéristique des prostaglandines <sup>122</sup>.

### 1.3.3. Agent pharmacologique (Ibuprofen)

Les cyclooxygénases sont sans doute les cibles thérapeutiques les plus convoitées de toute l'histoire pharmaceutique. Chaque année, des milliers de tonnes d'inhibiteurs de cet enzyme sont consommés dans le monde. Depuis le début des années 90, la communauté scientifique a effectuée beaucoup de recherches sur les deux cyclooxygénases. L'Ibuprofène est le produit d'un long programme de recherche pendant les années 50-60 dans le but de développer une « super aspirine » pouvant soulager les douleurs relative à l'arthrite rhumatoïde <sup>123</sup>. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent la COX-2, afin d'enrayer l'inflammation, mais bloquent également la COX-1, causant des effets indésirables. En effet, les AINS inhibent les deux cyclooxygénases, mais avec une légère préférence pour la COX-1. Cette préférence cause principalement de la toxicité gastrointestinale. Cependant, des efforts ont permis de révolutionner le marché thérapeutique en développant des médicaments qui inhibent sélectivement la COX-2. Les chercheurs ont donc exploité les différences





**Figure 10 :** Site d'action d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (*traduite de Rang, Dale, Ritter et Moore*)<sup>9</sup>.

entre les sites de liaison des deux COX pour synthétiser des molécules très sélectives pour la COX-2, éliminant du même coup les effets secondaires causés par l'inhibition de la COX-1 <sup>122</sup>. Ainsi, le développement de Vioxx<sup>®</sup> et de Celebrex<sup>md</sup>, des inhibiteurs de COX-2, a été possible grâce à la poche formée dans le site de liaison par la substitution d'une isoleucine pour une valine à l'acide aminé 523 <sup>124</sup>.

#### 1.3.4. Implications en grossesse

Il y a déjà un certain temps que nous savons que les prostaglandines sont impliquées dans l'ovulation, la fertilisation et l'implantation du blastocytes <sup>125</sup>. L'inhibition de la COX-2 chez des souris femelles provoque d'importants troubles reproducteurs, liés à l'ovulation, la fertilisation, l'implantation et la décidualisation <sup>8</sup>. Chez l'humain, des études montrent que l'inhibition sélective de la COX-2 aurait un effet négatif sur l'ovulation soit une rupture folliculaire retardée n'affectant pas les niveaux d'hormones circulants <sup>126</sup>. La COX-1, quant à elle, serait essentielle pendant l'accouchement puisque son absence engendre la mort fœtale en *peripartum* <sup>127</sup>. Lors de la parturition, les COX-1 et -2 auraient des rôles distincts essentiels. La COX-1, constitutivement présente, est probablement l'isoforme qui contrôle les stades précoces de l'accouchement soit les contractions utérines et le début de la dilatation cervicale <sup>125</sup>. Cependant, une étude montre que des souris gestantes invalidées pour la COX-1 et l'oxytocine ont eu une grossesse semblable aux animaux normaux. Toutefois, la durée du travail et de l'accouchement a été beaucoup plus longue <sup>127</sup>. Chez la brebis, des données récentes vont jusqu'à montrer que la COX-1 serait responsable du tonus vasculaire utérin <sup>128</sup>. Ces résultats semblent dire que la COX-1 est essentielle, du moins pour une partie, de la grossesse. Quant à la COX-2, elle serait fortement induite par les cytokines proinflammatoires produites par la décidua, le trophoblaste et les membranes fœtales. Ces médiateurs de l'inflammation génèreraient la synthèse de prostaglandines ayant pour effet de maintenir la contraction du myomètre et d'effacer le col de l'utérus pour permettre l'expulsion du fœtus <sup>125</sup>. Ces

observations justifient que, depuis quelques années, des inhibiteurs de la COX-2 sont utilisés comme agent tocolytique (substance qui diminue ou arrête les contractions utérines). On a également constaté que la COX-2 était augmentée dans les membranes amniotiques après l'accouchement, mais pas la COX-1 <sup>129</sup>. Également, l'injection d'antisens contre la COX-2, inhibe l'expression de l'ARN<sub>m</sub> de la COX-2 et de la protéine tout en retardant le moment de l'accouchement chez des souris gestantes traitées aux endotoxines <sup>130</sup>.

#### **1.4. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL**

Tel que mentionné précédemment, la grossesse est associée à de multiples changements hémodynamiques auxquels les composantes de la paroi vasculaire jouent un rôle important : régulation du tonus vasculaire, perméabilité vasculaire, réponse inflammatoire et métabolisme de plusieurs médiateurs vasoactifs. Cette étude a donc été entreprise dans l'optique de caractériser le remodelage des vaisseaux utérins pendant la grossesse et à déterminer quels sont les éléments impliqués dans ce remodelage. Déjà plusieurs évidences soutiennent que l'ET pourrait être l'un des joueurs important dans ce processus. Nous suggérons que l'endothéline participe dans le remodelage des vaisseaux utérins lors de la gestation. Ce peptide pourrait agir via une modification de l'expression de ses récepteurs et pourrait également impliquer des produits des cyclooxygénases. Ainsi, le premier volet de l'étude se concentre sur la caractérisation de la contraction des artères arquées utérines à l'ET et sa modulation pendant la grossesse. Un autre objectif est de comparer l'expression des récepteurs de l'ET (ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) dans les deux groupes de rates.

Puisqu'il a été démontré que les effets vasculaires de l'ET sont potentialisés ou modulés par la relâche, induite par l'ET, de métabolites de l'acide arachidonique, la seconde section du projet porte sur l'implication des produits des cyclooxygénases sur la contraction à l'ET dans les artères arquées utérine et leur modulation pendant la grossesse. Les objectifs sont de déterminer les effets d'une inhibition des cyclooxygenases sur la contraction induite par l'ET-1 ainsi que l'expression de ces enzymes (COX-1 et COX-2) chez des rates non gestantes et gestantes.

## **2. ARTICLE**

## ACCORD DES COAUTEURS

### Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Pascale Guérin  
M.Sc. en Pharmacologie

2. Description de l'article

Auteurs : Pascale Guérin, MSc; Benoit Sicotte, BSc; Jean St-Louis, PhD  
Titre : *Endothelin receptors mediating vasoconstriction in uterine arcuate artery in term pregnant rats.*  
L'article est présentement en phase finale de préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pascale Guérin inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *Caractérisation des effets et des récepteurs de l'endothéline dans la vasculature utérine lors de la gestation.*

Jean St-Louis	<div>(information retirée / information withdrawn)</div>	<u>25 septembre 2006</u>
Coauteur	Signature	Date
Benoit Sicotte	<div>(information retirée / information withdrawn)</div>	<u>25 septembre 2006</u>
Coauteur	Signature	Date
Richard Larivière	<div>(information retirée / information withdrawn)</div>	<u>23 septembre 2006</u>
Coauteur	Signature	Date

# **Endothelin receptors mediating vasoconstriction in uterine arcuate artery in term-pregnant rats**

**Short title:** Endothelin receptors in uterine arteries of pregnant rats

**Summary sentence:** ET-1 vasoconstriction on vascular smooth muscle of rat uterine artery is ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> mediated and probably dependent on prostaglandin synthesis by COX-2.

**Keywords:** Endothelin Receptors, Cyclooxygenase, Pregnancy, Uterine artery

Pascale Guérin<sup>1</sup>, Benoit Sicotte<sup>1</sup>, Richard Larivière<sup>2</sup>, Jean St-Louis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie Vasculaire Périnatale, Département d'obstétrique-gynécologie et de Pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5 <sup>2</sup>Reserch Center and Division of nephrology and hypertension, CHUQ, Hôpital de l'Hôtel-Dieu de Québec and Departement of Medecine, Université Laval, Québec, Canada, G1R 2J6

**Grant support:** Supported by the Canadian Institutes of Health Research #62790

## ***Correspondence and reprint requests:***

Jean St-Louis, Ph.D.

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine

3175 Chemin Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

Telephone: [information retirée / information withdrawn]

Fax: [information retirée / information withdrawn]

e-mail: [information retirée / information withdrawn]

## Abstract

During pregnancy, uterine circulation undergoes important structural and functional modifications to help satisfy fetal requirements. For example, uterine blood vessels undertake major hypertrophy. Indeed, arcuate uterine arteries double their diameter and increase their reactivity to vasoconstrictor agents. Recent studies suggested increased production of endothelin (ET) during pregnancy. Therefore, we questioned the implication of ET in uterine vascular remodeling during pregnancy. To characterize ET receptor subtypes (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>) involved in the contractile response to ET in the uterine circulation of non pregnant (Np) and pregnant rats (Pg), we have measured, using wire myographs, its contractile responses of uterine arcuate arteries. Vessel segments were stretched to mimic a passive tension equivalent to 50 mm of Hg and were exposed to different effectors of ET receptors. Western blots and immunofluorescence were used to evaluate tissue expression of ET receptors. Maximal responses to ET-1 and ET-3 were increased in arcuate arteries of pregnant compared to Np rats. ET-1 was more powerful than ET-3 to contract arcuate uterine arteries of Np rats, while both agonists produced equipotent responses in arteries of Pg. Responses to sarafotoxin 6c (S6c), an ET<sub>B</sub> agonist, were only obtained in arteries of Pg rats. The ET<sub>A</sub> antagonist, BQ123, strongly inhibited ET-1 responses in arteries of Np rats exclusively. BQ 788, an ET<sub>B</sub> antagonist, significantly right shifted S6c response-curve of arteries of Pg rats. Combination of the two selective antagonists' right shifted ET-1 contraction curve in both groups while bosentan, a non selective ET receptor antagonist, was more potent in blocking the vascular contractions in uterine arcuate arteries. Response to ET-1 in arteries of Pg rats was importantly reduced in the presence of ibuprofen. Expression of ET receptors was measure by Western blot and immunofluorescence and reveal increased expression of only the ET<sub>B</sub> in the endothelial lining of the uterine arteries during pregnancy. These results suggest that contractile responses to ET are mediated by the ET<sub>A</sub> receptor in arcuate uterine arteries of Np rats, while the ET<sub>B</sub> receptors appear to be also involved during pregnancy. Furthermore, endogenous liberation of some cyclooxygenases (COX) products was observed to participate to ET-1 responses and expression of COX-2 was measure by Western blot and reveal increased expression during pregnancy.

**Key words:** endothelin, receptor, pregnancy, uterine artery, vascular remodeling, cyclooxygenase, rat, BQ123, BQ788, Bosentan, Ibuprofen.



## **I. Introduction**

Pregnancy in the rat is associated with multiple hemodynamic alterations including increased uterine blood flow to accommodate foetal growth requirements. Uterine blood vessels modify their structure to adapt to this condition. Indeed, Osol et al.<sup>1</sup> showed, in pressurized uterine radial artery from late pregnant rat, an increased distensibility in diameter (by 60%) and in axial length (4.8 times). Uterine arterial remodeling occurring during pregnancy is characterised by both hypertrophy and hyperplasia of the different constituents of the arterial wall<sup>2</sup>. It was also demonstrated that uterine arcuate arteries from term pregnant rat double their diameter and that is accompanied by increased stiffness of the vessel<sup>3</sup>. Together with these morphological and mechanical changes, increased reactivity, measured with arteriograph or myograph, to vasoconstrictors was reported for agents like angiotensin II (AngII), phenylephrine (PhE) and KCl<sup>3,4</sup>.

Endothelin (ET) is a potent vasoconstrictor peptide composed of 21 amino acid residues. There are three isoforms of endothelin, ET-1, ET-2 and ET-3. ET-1, produced by endothelial cells, is the predominant isoform in vascular tissue. The peptide is active on the two receptor subtypes, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. Smooth muscle cells mostly express ET<sub>A</sub> receptors, that mediate vasoconstriction, while endothelial cells express ET<sub>B</sub> receptors that induce relaxation via the production of nitric oxide and prostaglandins (see<sup>5</sup> for a review). However, evidences are suggesting some role for ET<sub>B</sub> receptors in vasoconstriction, in human forearm resistance and capacitance vessels, in rat mesenteric artery<sup>6</sup>, rabbit saphenous vein<sup>7</sup>, and pulmonary artery<sup>8</sup>. In non-pregnant and pregnant rats, both endothelin receptors contribute to blood pressure homeostasis<sup>9</sup>. However little is known about the endothelin receptors implicated in vascular tone of the uterine vascular bed, particularly during pregnancy. It has been reported that endothelin-1 regulates uterine vascular tone during pregnancy in human and sheep<sup>10, 11</sup>. Therefore, this study was undertaken to determine the effects of ET on uterine arterial arteries, as affected by pregnancy-induced remodeling of uterine vasculature, and to characterise the receptors or mechanisms mediating responses to ET in these blood vessels. We also evaluated, in isolated uterine arcuate, the impact of a cyclooxygenase blockade on ET-1-induced contractions. Our data suggest that ET<sub>A</sub> is the receptor mediating responses to ET-1, and that at term pregnancy, ET<sub>B</sub> receptors also participate to ET-1 induced vasoconstriction, together with some cyclooxygenase products.

## **II. Methods**

Female rats (225-250g, Charles River Canada, St-Constant, QC) were mated overnight with aged matched males. The detection of sperm on vaginal smears in the morning confirmed the rats as being at day 1 of gestation. The pregnant rats were then placed in individual cages until sacrificed on the 22<sup>nd</sup> day of gestation, the eve of parturition. Non-pregnant rats of the same age served as controls without considering stages of the estrus cycle. Animals were housed in Research Center facilities of CHU Sainte-Justine, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. The local animal care committee approved the protocol.

### Myotropic responsiveness

The animals were sacrificed by decapitation and uterine horns with attached blood vessels were removed and placed in ice-cold Krebs bicarbonate solution (KBS). Dissection of arcuate artery was performed under a stereomicroscope to set up in wire myographs. Two lengths of tungsten wire (25  $\mu$ m diameter) were passed into the lumen of the vessel, to secure the artery segment (about 1.5 mm long) to supports of the myograph (TIS8105R, Kent Scientific, Litchfield, CT). One support was attached to a strain gauge force transducer while the other was connected to a micrometer-measuring device. Force was recorded on a personal computer using Polyview Data acquisition and analysis system (Astromed Inc., West Warwick, RI). Arteries were bathed in 5ml KBS of the following composition in mmol/L: 118 NaCl; 4.65 KCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.18 MgSO<sub>4</sub> and 5.5 dextrose. The KBS solution was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, pH was 7.4. The artery segment was stretched three times to prevent hysteresis and was allowed to equilibrate for 60 min. without passive tension.

A passive length-tension relationship was generated by progressively increasing the distance between the supports of the myograph (by step of 25  $\mu$ m). Results were fitted to an exponential equation that intercepts the straight line of Laplace for a pressure of 50 mmHg. Diameter at which the two lines intercept was used as passive tension on the vessel walls. After 20 min. equilibration at this tension, vessels were challenged with 1 $\mu$ mol/L PhE and at plateau response, the absence of functional endothelium (previously removed by gentle rubbing with tungsten wires) was verified with 100  $\mu$ mol/L carbachol. Only arteries that did not show relaxation to carbachol were used.

Responses to endothelin agonists were measured after a 60-min. equilibration period. Cumulative concentration-response curves (c-r c) were constructed for ET-1 (0.1 nM/L-0.3 μmol/L), ET-3 (0.1 nM/L-0.3 μmol/L) or sarafotoxin 6c (S6c) (0.01-30 nM/L). Only one curve was measured on each preparation. In an other set of tissues, the effects of ET<sub>A</sub> antagonist (BQ123, 3 μmol/L) and ET<sub>B</sub> antagonist (BQ788, 3 μmol/L) alone and in combination were studied on ET-1 contraction. The effects of the non specific endothelin receptor antagonist Bosentan (1 μmol/L) and the COX inhibitor Ibuprofen (10 μmol/L) were also measured on ET-1 responses. Concentrations of antagonists were chosen according to their ability to completely antagonise the ET response on isolated rat aorta rings (BQ123) and the S6c response of the rat uterine arcuate artery (BQ788) (data not shown).

#### Western analysis

Whole uterine circulation from pregnant and non-pregnant rats was dissected from uterine horn, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Vessels from 2-5 uterine horns were pulverized with a mortar and pestle pre-chilled in liquid nitrogen, placed in 1 ml homogenisation buffer (25 mM tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA and 1mM EGTA) and homogenised on ice with a rotor/stator homogenizer (Biospec Products inc, Bartlesville, OK, 4.5 mm probe diameter, 2 times 10 sec., full speed). Homogenates were centrifuged at 3000 rpm and supernatant protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad) using BSA as standard.

Equivalent amounts of protein were separated by electrophoresis with a 10 % polyacrylamide-SDS resolving gel (1 Hr, 200 V) and transferred on nitrocellulose membrane overnight (25 V, 4 °C). Membrane was blocked with 5% dry skim milk in TBST (50 mmol/L Tris base [pH 7.5], 150 mmol/L NaCl and 0.1 % Tween-20). It was thereafter incubated with either ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub> rabbit antibodies (Alomone Labs, 1:1000 (lot #AN-06) and 1:500 (lot #AN-02), respectively) for 1 hour at room temperature under constant agitation. The membrane was then washed and incubated with donkey anti-rabbit horseradish peroxidase antibody (Amersham Bioscience, 1:2000) for 30 min. After washing immunocomplexes were detected by chemiluminescence (Amersham Bioscience, ECL Western Blotting System) on Hyperfilm (Amersham Bioscience) and visualized with a computer-based imaging system (Alpha Imager, Alpha Innotech inc). Quantification was performed by densitometric analysis.

Similar conditions were used to quantify the expression of COX-1 and COX-2 except that 9% polyacrylamide resolving gel was used and incubation was performed with either COX-1 or

COX-2 rabbit antibodies (Cayman Chemical, 1:200 (114072- 114073) and 1:200 (115324- 115325), respectively) for 1 hour at room temperature under constant agitation.

Beta actin was used as internal control and expression of ET receptors and COX were normalized relative to actin. As actin and ET receptors are of similar molecular weight, membranes were stripped after ET-receptor detection. They were incubated in stripping solution (Tween-20 0.05% (v/v), 0.2 mol/L glycine, pH 2.5) for two periods of 1 hour at 70°C. After washing with TBST, membranes were blocked again and incubated 1 hour with anti-actin mouse monoclonal antibody (Novus Biological, 1:10000). After washing they were incubated with anti mouse HRP-linked antibody (Amersham Bioscience, 1:500 in TBST + 5% milk) for 30 min. and protein bands detected as mentioned above.

### Immunofluorescence

Tissue were fixed in OCT (Optimal Cutting Temperature compound) and, once frozen, store at -80°C until ready to section. Artery cross-sections of 10µm were fixed in 100% acetone for 10 min. and then blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) diluted in phosphate buffered saline (PBS) for 1 hour at room temperature. The sections were overlaid in a humidified box with primary polyclonal antibodies against either rat ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub> receptors (Alomone Labs, 1:200 (lot #AN-08) and 1:100 (lot #AN-04) respectively). All sections were then washed with PBS and incubated with a dye-labeled secondary anti-rabbit antibody Alexa Fluor 594 (Invitrogen Molecular Probe, 1:1000). Tissues were counter-stained with the Alexa Fluor 488 conjugated Phalloidine (Invitrogen Molecular Probe, 1:150) to locate smooth muscle cells (interacts with actin filaments). The immunofluorescence was observed on a confocal microscope (MRC-1024 Confocal System, Bio-Rad, CA, USA) combined with the Laser Sharp image acquisition software 3.2. The intensity of fluorescence was analyzed using the Metamorphe software (Universal Imaging Corporation, PA, USA). Comparison of fluorescence levels between the different experimental groups was performed with either the immunofluorescence reaction for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, using the same condition of laser exposure and image acquisition time. At the settings, tissue autofluorescence (obtained in the absence of the secondary antibody) and non-specific fluorescence (obtained by omitting the first specific antibody) were barely detectable, and were subtracted from total fluorescence resulting in specific fluorescence.

### Drugs and chemicals

All salts employed in these experiments were of analytical grade obtained from Fisher Scientific (Montréal, Qc). Endothelin-1 (ET-1), endothelin-3 (ET-3), sarafotoxin S6c (S6c), BQ123 (cyclo(-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu), BQ788 (N-cis-2,6Dimethylpiperidinocarbonyl- $\beta$ -tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)-D-Nle-OH), Ibuprofen ( $\alpha$ -Methyl-4-[isobutyl]phenylacetic acid), phenylephrine hydrochloride (PhE) and carbachol hydrochloride (Cbc) were purchased from Sigma RBI (Oakville, Ontario). Bosentan (Ro 47-0203/001, 4-ter-Butyl-N-[2-hydroxy-ethoxy]-5-(2-methoxy-phenoxy)2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamide sodium salt) was a generous gift from Actelion (Basel, Switzerland).

### Data analysis

Concentration-response curves were analysed by computer fitting to a four parameters logistic equation  $Y = \frac{E_{max}}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X)Pente}}$  (« X » is the logarithm of the agonist concentration and « Y » is the % of the contraction obtain) (Prism 4, GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the concentration required to produce 50% maximum response ( $EC_{50}$ ) and maximum response ( $E_{max}$ ). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) along with the best-fitted curve to mean data points. Two-group comparison was done by Student's t test. Multiple group analysis was performed with one way ANOVA followed by Bonferroni comparison. Values were considered to be statistically significant when reaching a probability of  $p < 0.05$ .

## **III. Results**

### Myotropic responses to ET agonists

Figure 1 shows concentration-response curves to ET-1, ET-3 and S6c on uterine arcuate artery of non-pregnant (Np) and term pregnant rats (Pg). Maximal response ( $E_{max}$ ) to ET-1 was increased in arcuate arteries of Pg rats ( $1.35 \pm 0.23$  vs  $1.90 \pm 0.23$  mN/mm for Np and Pg rats respectively,  $p < 0.05$ ). Pregnancy did not change sensitivity ( $-\log EC_{50}$ : Np,  $8.32 \pm 0.12$ , and Pg  $8.56 \pm 0.19$ , N.S.). ET-3 reached similar level of contraction than ET-1 in arcuate artery of Np and Pg rats with a  $E_{max}$  of respectively  $1.38 \pm 0.26$  vs  $2.19 \pm 0.16$  mN/mm,  $p < 0.01$ . In both group of tissues the effect of ET-3 was significantly right shifted compared to ET-1 concentration-response curve (by  $EC_{50}$  being  $7.58 \pm 0.22$  vs  $8.04 \pm 0.10$  for Np and Pg rats respectively,  $p < 0.05$ ). Results for both ET-1 and ET-3 indicate an increased sensitivity to these agonists in uterine arcuate arteries of Pg compared to Np rats. Concentration-response curves

obtained with S6c were strikingly different in the two groups of arteries. In the ones of Pg rats, S6c reached a maximal response of  $1.48 \pm 0.11$  mN/mm with a  $pD_2$  of  $9.42 \pm 0.22$ , while arteries of Np rats almost failed to respond to this agonist. It is interesting to note that this maximal contraction to S6c was significantly smaller compared to that of ET-1 and ET-3. Taken together, these results indicate that at term pregnancy,  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors are both involved in uterine arcuate artery response to ET.

#### Effects of $ET_A$ and $ET_B$ antagonists on contractile response to ET-1

To evaluate the contribution of  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors on ET-1 contractions, we investigated the effects of two selective antagonist peptides: BQ123<sup>12</sup> and BQ788<sup>13</sup>. Figure 2 presents the concentration-response curves to ET-1 in the absence or presence of 3 $\mu$ M BQ123 or BQ788. On arteries of Np rats, BQ123 interfere with responses to ET-1 (Fig. 2A). The inhibition is so important that the contraction failed to reach plateau response. If we assume that  $E_{max}$  of ET-1 had reached similar level in the presence as in absence of BQ123, then the slopes of the curves were quite different suggesting a non competitive mechanism of inhibition. This could indicate some indirect mechanisms in vasoconstrictor action of ET-1 in this tissue. However, in arteries of the pregnant group (Figure 2B), the small displacement to the right of the concentration-response curve in the presence of BQ123 was not significant on  $pD_2$  ( $8.33 \pm 0.13$  vs  $8.09 \pm 0.18$ , NS) and maximal contraction ( $1.86 \pm 0.14$  vs  $1.58 \pm 0.17$  mN/mm, NS). BQ788 alone had no effect on the contractile response induced by ET-1 in both groups of rats (Figure 2C-D). Combination of the two antagonists also produced different effects in arteries of the two groups. In Np rats, the inhibitors induced reduction of both  $E_{max}$  and sensitivity ( $pD_2$ ) to ET-1, while in arteries of Pg rats it only reduced sensitivity ( $pD_2$ ) (Figure 3A). To verify these observations, we used a non specific antagonist of  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors, bosentan, that significantly reduced maximal response in both Np and Pg condition (Np:  $1.12 \pm 0.15$  vs  $0.58 \pm 0.06$  mN/mm,  $p < 0.05$  and Pg:  $1.49 \pm 0.11$  vs  $1.01 \pm 0.13$  mN/mm,  $p < 0.05$ ). Furthermore, bosentan affected  $pD_2$  of the Pg group ( $8.40 \pm 0.14$  vs  $7.86 \pm 0.18$ ,  $p < 0.01$ ) but failed to change sensibility to ET in Np preparations ( $8.83 \pm 0.46$  vs  $8.10 \pm 0.16$ , NS) (Fig. 3B).

#### Expression of $ET_A$ and $ET_B$ receptors in the uterine vasculature of the rat

In order to investigate ET receptor expression during pregnancy, we carried out Western blot analysis on uterine vasculature of Pg and Np rats. It revealed that  $ET_B$  receptors expression

was increased (Fig. 4B), by more than 2 fold ( $p < 0.001$ ), at the end of pregnancy while  $ET_A$  was not changed (Fig. 4A). However, ET-immunofluorescence in the smooth muscle layer did not confirm these data since no significant changes in the expression of either receptor were observed (Fig. 4C-D), while  $ET_B$  receptors in the endothelium are increased by almost 2 fold ( $p < 0.05$ ) (data not shown).

#### Effects of Ibuprofen on contractile response to ET-1 and S6c

We studied the effect of COX blockade on the ET-1 and S6c-induced contractions on uterine arcuate arteries. COX inhibition produced an attenuation of the magnitude of the vasoconstriction in Pg rats arcuate arteries ( $1.58 \pm 0.11$  vs  $0.77 \pm 0.08$  mN/mm,  $p < 0.001$ ) without any change in  $pD_2$  (Figure 5B). In contrast, statistical significance was not achieved for either  $E_{max}$  or  $pD_2$  in non pregnant rats ( $0.77 \pm 0.07$  vs  $0.56 \pm 0.05$  mN/mm, NS and  $8.59 \pm 0.18$  vs  $8.23 \pm 0.14$  mN/mm, NS)(Figure 5A). To further explore the implication of COX, we determined if these enzymes were induced by the stimulation of receptor  $ET_B$  since their implication is manifested only in Pg rats. We examined the contraction response to  $ET_B$  agonist S6c in preincubated with ibuprofen arteries (Figure 5C). Ibuprofen diminished the maximal contraction to S6c at term ( $0.72 \pm 0.06$  vs  $0.51 \pm 0.05$  mN/mm,  $p < 0.001$ ). Furthermore, just like in ET-1 contraction response, Ibuprofen does not affect  $pD_2$  in S6c mediated contraction ( $9.10 \pm 0.09$  vs  $8.94 \pm 0.11$  mN/mm, NS).

#### Expression of COX-1 and COX-2 in the uterine vasculature of the rat

To identify the COX responsible for the involvement of contractile mediator and to quantify the increased synthesis of COX induced by pregnancy in uterine vasculature, we performed Western analysis for COX-1 and COX-2 (Figure 6). Subsequent quantitative analysis confirmed that COX-2 protein was 4.6 fold greater in the uterine vasculature of term pregnant rats than non pregnant rats ( $p < 0.05$ ). On the other hand, there were no significant changes in COX-1 expression.

### **IV. Discussion**

This study was conducted to examine the impact of pregnancy associated remodeling of uterine circulation on endothelin responses and functional expression of receptors subtypes. Indeed, previous studies have demonstrated some vasoconstrictor role for  $ET_B$  in several vascular beds in pathological conditions, but their implication in normal physiological situation

is still not established. Endothelin-induced vasoconstriction was mediated by ET<sub>A</sub> receptors in uterine arcuate artery from non-pregnant rats in that: 1) ET-1 was more potent than ET-3, 2) Sarafotoxin 6c did not contract these vessels and 3) action of ET-1 was inhibited by BQ123. ET<sub>B</sub> receptors were involved in ET-1 vasoconstrictor response in term pregnant rats because: 1) ET-1 and ET-3 were equipotent, 2) S6c induced vasoconstriction that was inhibited by BQ788 (data not shown) and 3) BQ123 does not have any significant effect on ET-1 response. During pregnancy, isolated uterine arcuate arteries demonstrate increased contractile response to vasoconstrictors agents like phenylephrine and angiotensine II<sup>3, 4</sup>. The present data with endothelin peptides are in agreement with this phenomenon, because, responsiveness to ET-1 and ET-3 increased in arteries of pregnant rats. It was suggested that increased responsiveness to Ang II and Phe was linked to modification in the mechanical properties of the vessels such as increased stiffness or tissue remodeling, especially for receptors coupled to G-protein<sup>3</sup>, this may also apply to endothelin.

Endothelins bind on two receptor subtypes, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, characterized on the basis of their structure and pharmacological properties. ET-1 has equal affinity for both types of receptors whereas ET-3 binds ET<sub>B</sub> receptors with higher affinity<sup>5</sup>. According to this classification, ET<sub>A</sub> receptors mediated vasoconstriction on uterine arcuate artery from Np rat since ET-1 was more potent than ET-3, while S6c was totally inefficant. This profile of agonist action is consistent with that seen in other ET<sub>A</sub> receptor containing tissues, such as rat renal artery<sup>14</sup> and thoracic aorta<sup>15</sup>. On the contrary, the two agonists have the same responsiveness in rabbit pulmonary artery<sup>8</sup> and rat small mesenteric arteries<sup>6</sup>, as in the present results on term Pg rat uterine arcuate artery. Added with the effectiveness of S6c to induced contraction in arteries of Pg rats only, it suggests that ET<sub>B</sub> receptors are also involved in this condition. Moreover, western blot analysis showed significant increase in the expression of ET<sub>B</sub> receptors in the whole uterine vasculature of term pregnant rat. However, immunofluorescence analysis on uterine arterial smooth muscle did not confirm this increased expression. These discrepant observations are partly due to an increased expression of ET<sub>B</sub> in arterial endothelium, but may also be due to veins present in western blot preparations but excluded in immunofluorescence samples (discrimination of arteries vs veins was done on the basis of morphological characterisation after phalloidine staining). It was previously shown that ET<sub>B</sub> is expressed in the umbilical vein rather than in the umbilical artery<sup>16</sup>. On the other hand, during pregnancy, ET-1 circulating levels are markedly higher in arterial than in venous blood suggesting limited physiological role for venous ET receptors<sup>17</sup>. Immunofluorescence samples were randomly



picked up at different level of uterine circulation, exclusively arteries, while western blot analysis used the whole vascular bed.

ET<sub>A</sub> blockade with selective competitive antagonist BQ123 did not antagonise the ET-1 responses on vessels of term pregnant rats while it strongly inhibited the constriction of arteries of non-pregnant animals. In addition, sarafotoxin 6c, a selective ET<sub>B</sub> receptor agonist, constricted uterine arcuate artery of pregnant rats only; this response was inhibited in a concentration dependent manner by BQ788 (data not shown). ET-1 induced vasoconstriction is of very long duration and practically unwashable<sup>18</sup>, indicating the pseudo irreversible nature of its binding to the receptor thus creating a non-equilibrium condition and making difficult antagonist studies. In fact, Wang et al.<sup>19</sup> concluded that the absence of effect of the antagonist BQ788 on ET-1 vasoconstriction was linked to the presence of only ET<sub>A</sub> receptors in the coronaries. However, Goodwin et al.<sup>20</sup> demonstrated that coronaries constricted to S6c, a specific ET<sub>B</sub> agonist. Schroeder et al.<sup>21</sup>, hypothesized that these results might be observed because of different selectivity of BQ788 for endothelial and smooth muscle ET<sub>B</sub> receptors. In addition, Zhang et al.<sup>22</sup> observed following ET<sub>A</sub> blockade with BQ123 some constriction of the coronary arteries. The lack of effect of BQ788 on ET-1 response in arteries of pregnant rats may also reflect the presence of both types of receptors in these blood vessels. It is compatible with the suggestion that BQ123 competes with ET-1 for binding to the ET<sub>A</sub> receptors making more ET-1 available to muscular ET<sub>B</sub> receptors<sup>23</sup>.

In order to investigate the cause of the residual BQ123 portion of the ET-1 response in pregnant animals and the absence of effect of BQ788, we combined BQ123 and BQ788. This treatment significantly right shifted the ET-1 response in arteries of both Pg and Np rats. Bosentan, a non peptidic and non selective ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> blocker, more effectively shifted of the concentration-response curve to ET-1 than with the mix of selective antagonists although the concentrations of each of the antagonists used herein was three times larger then the ones used in other studies in rat aorta<sup>15, 24</sup>. As said above, the lack of effect of BQ788 on the ET-1 response in Pg rats seems to indicate that ET<sub>A</sub> receptors are somehow able to overcome the ET<sub>B</sub> receptors blockade. Further experiments are required to clarify this tricky interaction between the two ET receptors present in the uterine arteries.

The experiments performed with Ibuprofen were meant to determine if arachidonic acid derivatives are synthesized during ET-1 stimulation. It was previously shown that pulmonary venous constriction to ET-1 in lamb depends on cyclooxygenase products<sup>25</sup>. Moreover, injection of ET into the pulmonary artery of guinea pig increased pulmonary

perfusion pressure by the means of concentration-dependent release of  $\text{TXB}_2$ <sup>26</sup>. The links between ET-1 and prostanoids were confirmed by other experiments which showed that ET-1 evoked significant increased in pressure in pulmonary arteries<sup>27-29</sup> and human placental cotyledons<sup>30</sup> that correlated with the release of  $\text{TXB}_2$ . In the lungs and kidneys, ET preferentially induces the release of vasodilator prostanoids while in other beds it stimulates the release of vasoconstrictor ones<sup>31</sup>. Our results in Pg uterine arcuate arteries clearly show the implication of some contractile cyclooxygenase products. At first sight, our western blots analysis showing no changes in COX-1 expression seem conflicting with demonstration that COX-1 expression is increased in the uterine artery of the sheep during pregnancy<sup>32</sup>. Further investigations by the same group showed that COX-1 is primarily located in the endothelium and is considerably decreased in endothelium denuded uterine arteries. Immunohistochemical studies confirm these observations<sup>33</sup> and are consistent with observations that production of  $\text{PGI}_2$  is greater in uterine arteries when the endothelium is present rather than in endothelium denuded arteries of the sheep<sup>34,35</sup>.

Interestingly, pre-incubation with Ibuprofen tend to bring back the magnitude of the contraction to the level of Np rats uterine arteries. It is consistent with studies that showed that rat endothelium-denuded aorta incubated with indomethacin or a thromboxane receptor antagonist did not affect the potency of ET, but only the maximal response<sup>36</sup>.

In summary, these studies provide new information regarding the functional distribution of  $\text{ET}_A$  and  $\text{ET}_B$  receptors within the rat uterine circulation. Endothelin-induced vasoconstriction appears to be mediated by  $\text{ET}_A$  receptor in uterine arcuate artery from non-pregnant rats while  $\text{ET}_A$  and  $\text{ET}_B$  receptor are involved in arteries at term pregnancy. Furthermore, ET-1 response, especially during pregnancy is also mediated by another constrictor mechanism, maybe of prostanoid type and it is probably synthesized by COX-2.

### **Acknowledgement**

Thanks to Nadia Chbinou from the Hôtel-Dieu de Québec hospital.

This work was supported by the grant 62790 from the Canadian Institutes for Health Research.

Figure 1

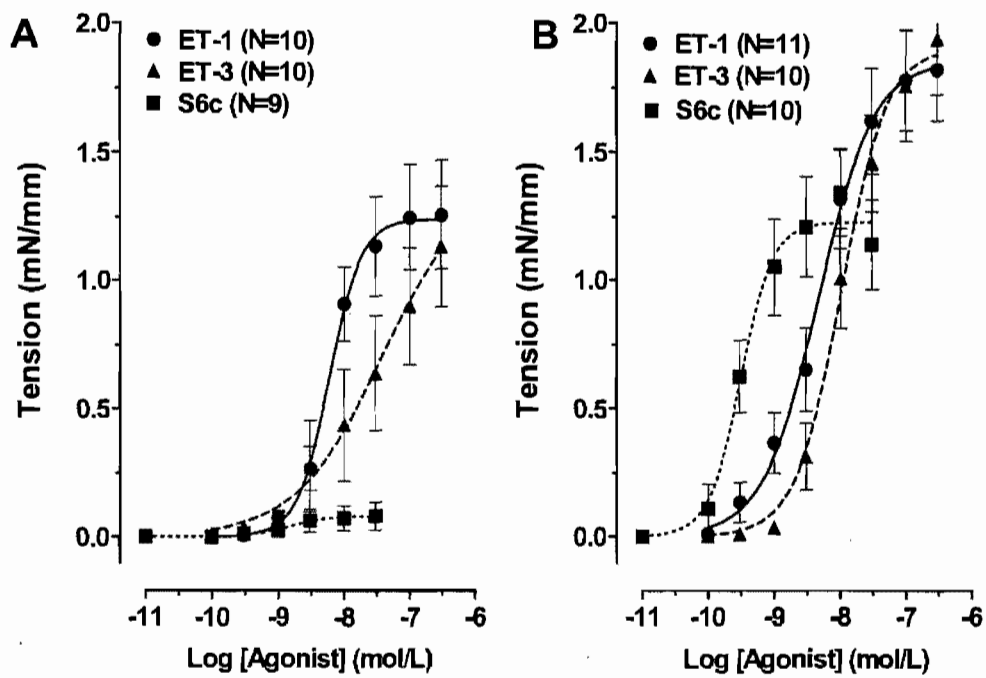


Figure 2

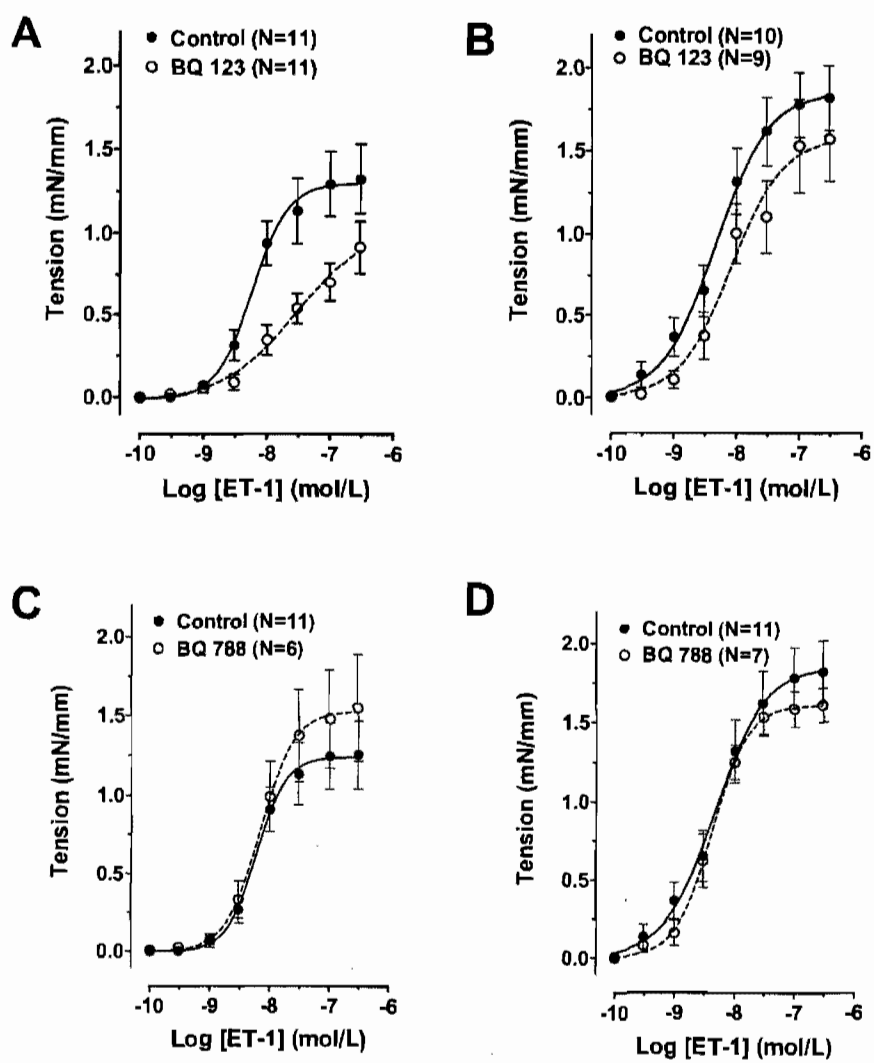


Figure 3

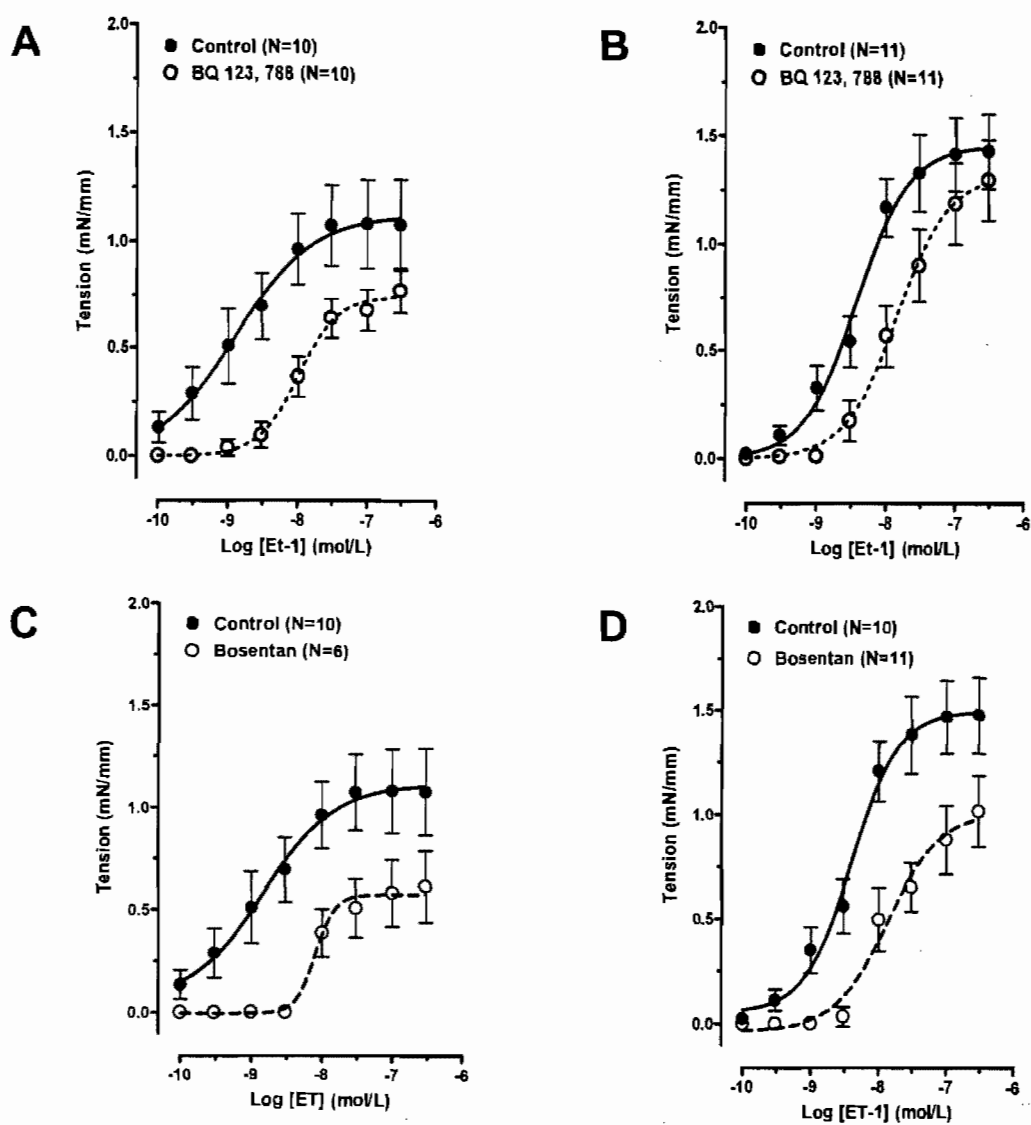


Figure 4

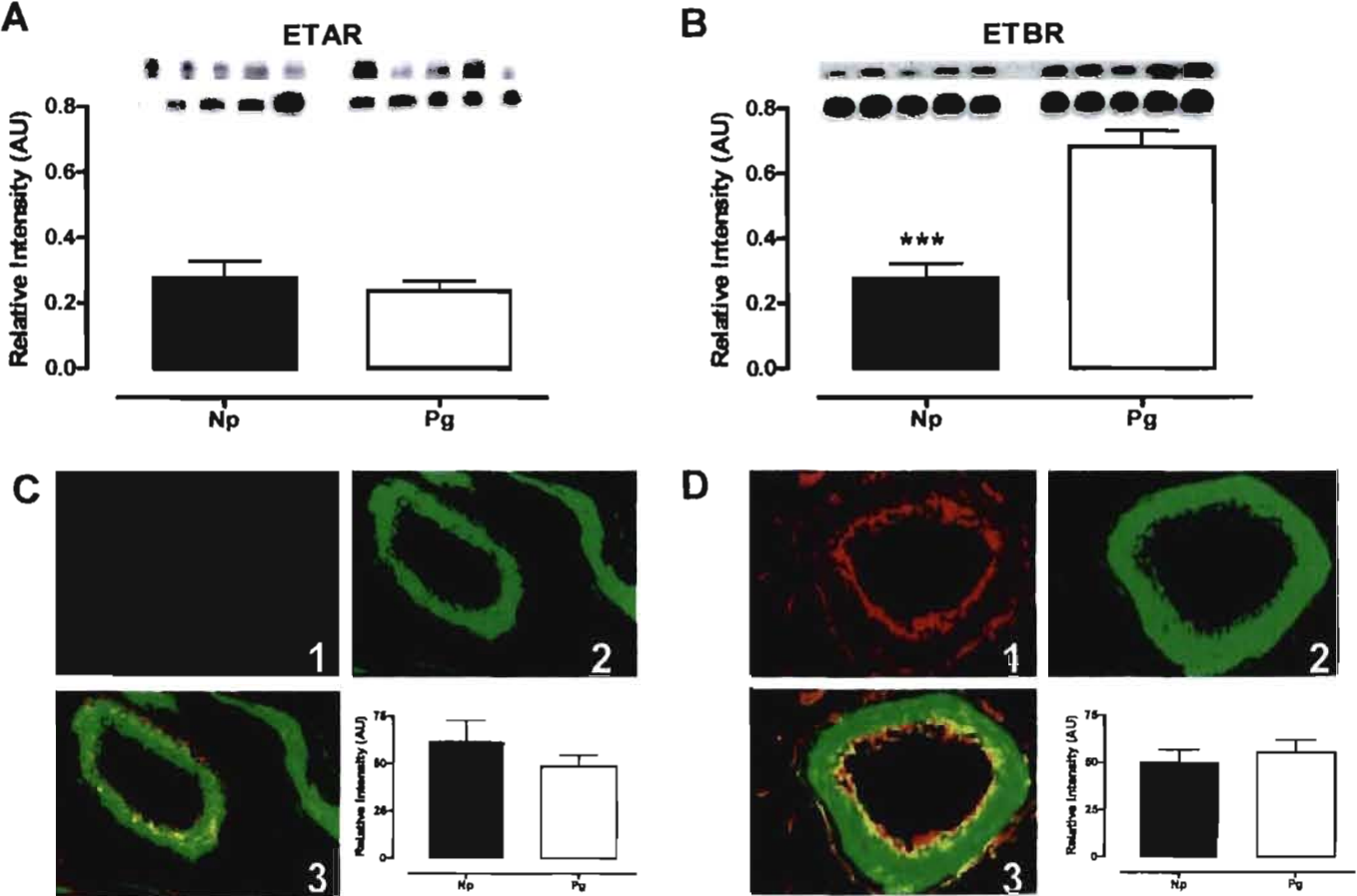


Figure 5

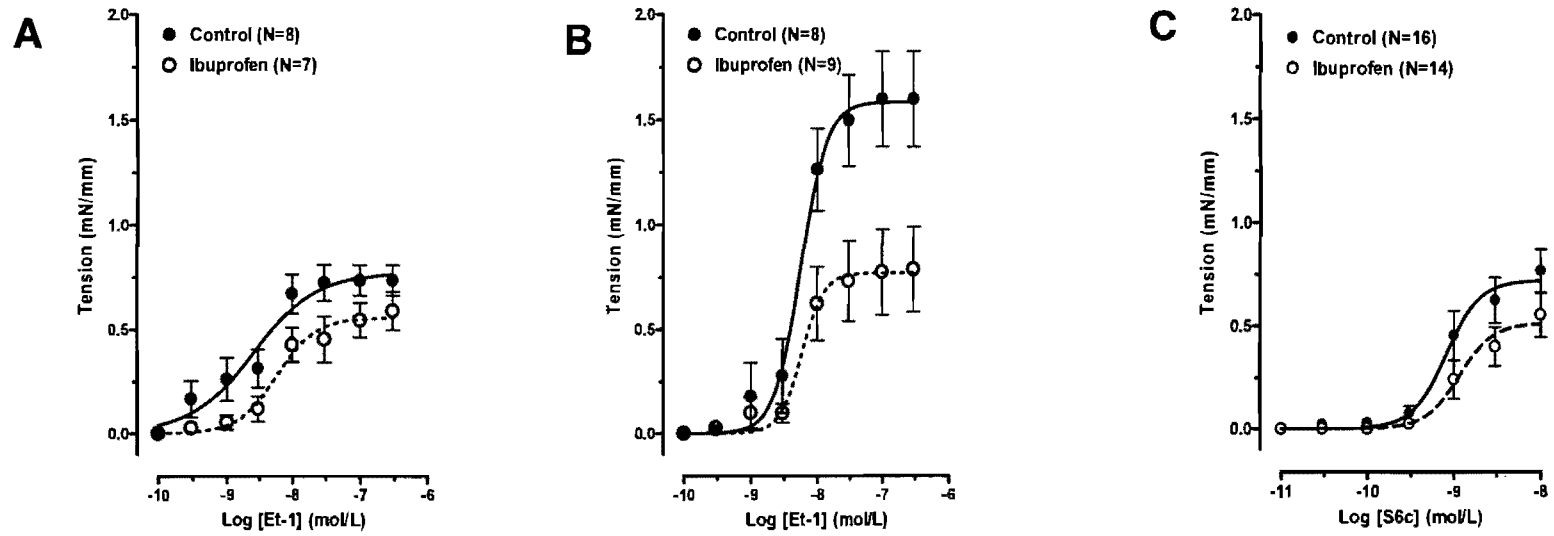
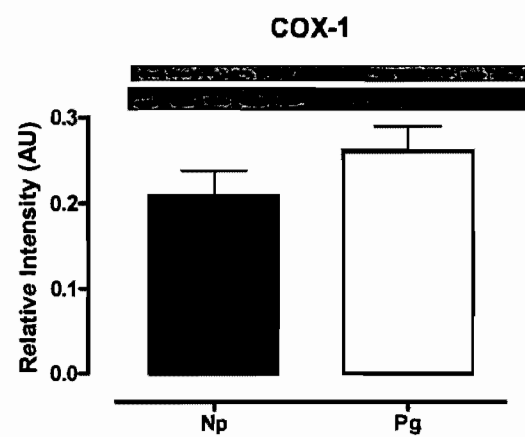
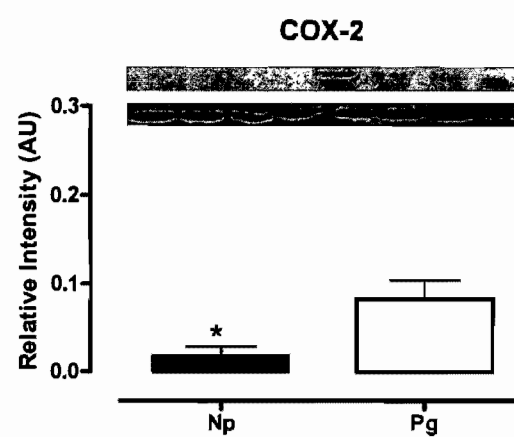


Figure 6

**A****B**



## **Figures legend**

**Figure 1.** Concentration-response curves to endothelin receptors agonists in endothelium-denuded arcuate uterine arteries of non pregnant (A) and pregnant (B) rats. Abscissa depicts log of ET-1 concentration while ordinate shows contractile response to ET-1 in mN/mm. Number of vessels used is 9 to 11, all from different animals.

**Figure 2.** Concentration-response curves to ET-1 in endothelium-denuded arcuate uterine arteries of non pregnant (A,C) and pregnant (B,D) rats. Effects of ET<sub>A</sub> specific antagonist BQ123 3 $\mu$ mol/L (A,B) and ET<sub>B</sub> specific antagonist BQ788 3 $\mu$ mol/L (C,D). Abscissa depicts log of ET-1 concentration while ordinate shows the contraction to ET-1 in mN/mm. Vessels used were all from different animals.

**Figure 3.** Concentration-response curves to ET-1 in endothelium-denuded arcuate uterine arteries of non pregnant (A,C) and pregnant (B,D) rats. Effects of combination of BQ123 3 $\mu$ mol/L and BQ788 3  $\mu$ mol/L (A,B) and of the non selective blocker: bosentan 1  $\mu$ mol/L (C,D). Abscissa depicts log of ET-1 concentration while ordinate shows the contraction to ET-1 in mN/mm. Vessels used were all from different animals.

**Figure 4.** A) Western immunoblots and B) Immunofluorescence showing protein expression of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in uterine vascular smooth muscle arteries of non pregnant (Np) and pregnant (Pg) rats. A) Data are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Each band represents a different homogenate composed of 2 to 3 uterine vascular tissues from different animals and each group contain 5 to 8 different homogenate. Relative intensity is express by the ratio of the protein of interest over  $\beta$ -actine. \*depict statistical significance ( $p \leq 0,05$ ) and \*\*\* is ( $p \leq 0,001$ ) B) On both panels, picture 1 shows the receptor of interest, picture 2 shows phalloidine staining of smooth muscle cells and picture 3 the merge of pictures 1 and 2. Data are means  $\pm$  SEM of 5 rats per group. Results are projection of 20 images (10  $\mu$ m). Relative intensity is express by the intensity protein of interest minus background.

**Figure 5.** Effects of cyclooxygenase inhibitor Ibuprofen on ET-1 and ET<sub>B</sub> specific agonist S6c (C) mediated contraction in endothelium-denuded arcuate uterine arteries of non pregnant (A)

and pregnant (B) rats. Abscissa depicts log of ET-1 or S6c concentration while ordinate shows the contraction in mN/mm. Number of vessels used is 7 to 10, all from different animals.

**Figure 6.** COX-1 and COX-2 in uterine vasculature (whole homogenate) of non pregnant (A) and pregnant (B) rats. Data are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Each band represents a different lysate composed of 2 to 3 uterine tissues from different animals and each group contain 5 to 8 different lysates. Relative intensity is express by the ratio of the protein of interest over  $\beta$ -actine. \*depict statistical significance ( $p \leq 0,05$ ) and \*\*\* is ( $p \leq 0,001$ ).

### Reference List

1. Osol,G. & Cipolla,M. Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **168**, 268-274 (1993).
2. Cipolla,M. & Osol,G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171**, 805-811 (1994).
3. St-Louis,J., Pare,H., Sicotte,B., & Brochu,M. Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am. J. Physiol* **273**, H1148-H1153 (1997).
4. D'Angelo,G. & Osol,G. Regional variation in resistance artery diameter responses to alpha-adrenergic stimulation during pregnancy. *Am. J. Physiol* **264**, H78-H85 (1993).
5. Haynes,W.G. & Webb,D.J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* **16**, 1081-1098 (1998).
6. Mickley,E.J., Gray,G.A., & Webb,D.J. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1376-1382 (1997).
7. Gray,G.A., Loffler,B.M., & Clozel,M. Characterization of endothelin receptors mediating contraction of rabbit saphenous vein. *Am. J. Physiol* **266**, H959-H966 (1994).
8. Hay,D.W., Luttmann,M.A., Beck,G., & Ohlstein,E.H. Comparison of endothelin B (ETB) receptors in rabbit isolated pulmonary artery and bronchus. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1209-1217 (1996).
9. Thaete,L.G. & Neerhof,M.G. Endothelin and blood pressure regulation in the female rat: studies in normal pregnancy and with nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension. *Hypertens. Pregnancy.* **19**, 233-247 (2000).
10. Greenberg,S.G., Baker,R.S., Yang,D., & Clark,K.E. Effects of continuous infusion of endothelin-1 in pregnant sheep. *Hypertension* **30**, 1585-1590 (1997).
11. McElvy,S., Greenberg,S., Baker,R.S., Khoury,J., & Clark,K.E. Effect of Ro 61-1790, a selective endothelin-A receptor antagonist, on systemic and uterine hemodynamics and fetal oxygenation in sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **186**, 55-60 (2002).
12. Warner,T.D., Allcock,G.H., & Vane,J.R. Reversal of established responses to endothelin-1 in vivo and in vitro by the endothelin receptor antagonists, BQ-123 and PD 145065. *Br. J. Pharmacol.* **112**, 207-213 (1994).
13. Ishikawa,K. *et al.* Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4892-4896 (1994).

14. Clark, K.L. & Pierre, L. Characterization of endothelin receptors in rat renal artery in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 785-790 (1995).
15. Sumner, M.J., Cannon, T.R., Munding, J.W., White, D.G., & Watts, I.S. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 858-860 (1992).
16. Bogoni, G. *et al.* Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1600-1604 (1996).
17. Kraayenbrink, A.A., Dekker, G.A., van Kamp, G.J., & van Geijn, H.P. Endothelial vasoactive mediators in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169**, 160-165 (1993).
18. Clozel, M. *et al.* Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365**, 759-761 (1993).
19. Wang, Q.D., Gonon, A., Shimizu, M., Sjoquist, P.O., & Pernow, J. Contribution of endothelin to the coronary vasoconstriction in the isolated rat heart induced by nitric oxide synthase inhibition. *Acta Physiol Scand.* **163**, 325-330 (1998).
20. Goodwin, A.T. *et al.* Coronary vasoconstriction to endothelin-1 increases with age before and after ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **41**, 554-562 (1999).
21. Schroeder, R.L., Keiser, J.A., Cheng, X.M., & Haleen, S.J. PD 142893, SB 209670, and BQ 788 selectively antagonize vascular endothelial versus vascular smooth muscle ET(B)-receptor activity in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 935-943 (1998).
22. Zhang, Y., Oliver, J.R., & Horowitz, J.D. Endothelin B receptor-mediated vasoconstriction induced by endothelin A receptor antagonist. *Cardiovasc. Res.* **39**, 665-673 (1998).
23. Wendel-Wellner, M. *et al.* Cellular localization of the endothelin receptor subtypes ET(A) and ET(B) in the rat heart and their differential expression in coronary arteries, veins, and capillaries. *Histochem. Cell Biol.* **118**, 361-369 (2002).
24. Karaki, H., Sudjarwo, S.A., & Hori, M. Novel antagonist of endothelin ETB1 and ETB2 receptors, BQ-788: effects on blood vessel and small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 168-173 (1994).
25. Toga, H., Usha, R.J., Hillyard, R., Ku, B., & Anderson, J. Endothelin effects in isolated, perfused lamb lungs: role of cyclooxygenase inhibition and vasomotor tone. *Am. J. Physiol* **261**, H443-H450 (1991).
26. Touvay, C. *et al.* Bronchopulmonary and vascular effect of endothelin in the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* **176**, 23-33 (1990).
27. Braquet, P. *et al.* Effect of endothelin-1 on blood pressure and bronchopulmonary system of the guinea pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**, S143-S146 (1989).

28. de Nucci G. *et al.* Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 9797-9800 (1988).
29. Pons, F. *et al.* Comparison of the bronchopulmonary and pressor activities of endothelin isoforms ET-1, ET-2, and ET-3 and characterization of their binding sites in guinea pig lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 294-300 (1991).
30. Wilkes, B.M. *et al.* Endothelin receptors in human placenta: relationship to vascular resistance and thromboxane release. *Am. J. Physiol* **258**, E864-E870 (1990).
31. Albertini, M. & Clement, M.G. The relationship between endothelins and eicosanoids in the vasculature. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **59**, 1-10 (1998).
32. Habermehl, D.A., Janowiak, M.A., Vagnoni, K.E., Bird, I.M., & Magness, R.R. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. IV. Cyclooxygenase isoform expression during the ovarian cycle and pregnancy in sheep. *Biol. Reprod.* **62**, 781-788 (2000).
33. Janowiak, M.A., Magness, R.R., Habermehl, D.A., & Bird, I.M. Pregnancy increases ovine uterine artery endothelial cyclooxygenase-1 expression. *Endocrinology* **139**, 765-771 (1998).
34. Magness, R.R. & Rosenfeld, C.R. Calcium modulation of endothelium-derived prostacyclin production in ovine pregnancy. *Endocrinology* **132**, 2445-2452 (1993).
35. Magness, R.R., Rosenfeld, C.R., Hassan, A., & Shaul, P.W. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. I. Effects of ANG II on PGI<sub>2</sub> and NO in pregnancy. *Am. J. Physiol* **270**, H1914-H1923 (1996).
36. Eglen, R.M., Michel, A.D., Sharif, N.A., Swank, S.R., & Whiting, R.L. The pharmacological properties of the peptide, endothelin. *Br. J. Pharmacol.* **97**, 1297-1307 (1989).

### **3. DISCUSSION**

Le but de la présente étude était de caractériser la réponse à l'endothéline dans les artères arquées utérines chez des rates non gestantes et gestantes. Nous avons réussi à démontrer à l'aide d'outils pharmacologiques que la contraction de l'artère arquée utérine induite par l'ET-1 chez la rate non gestante est médiée par le récepteur  $ET_A$  et que pendant la grossesse, le récepteur  $ET_B$  est aussi impliqué. L'expression des récepteurs de l'endothéline a été mesurée par immunobuvardage de type Western et par immunofluorescence qui ont révélé une augmentation de l'expression des récepteurs  $ET_B$  uniquement dans l'endothélium des artères utérines pendant la grossesse. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'implication des métabolites des cyclooxygénases dans la contraction à l'endothéline dans les artères arquées. En effet, nous avons démontré clairement la contribution d'un produit des cyclooxygénases dans la réponse à l'endothéline chez la rate gestante ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de la COX-2 par immunobuvardage de type Western dans la circulation utérine.

Une revue de la littérature sur l'endothéline et ses récepteurs nous permet de constater rapidement la complexité de ce système. On tente souvent de simplifier les observations obtenues à une simple augmentation ou diminution de l'ET-1 circulante et/ou aux variations des niveaux d'expression des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . En effet, il est largement reconnu que les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  musculaires ont un rôle de contraction et que les récepteurs  $ET_B$  endothéliaux, un rôle de relaxation. De plus, chaque tissu possède des réponses à l'ET qui lui sont propres et qui semblent correspondre à une distribution plus ou moins homogène des récepteurs. L'aorte, par exemple, ne possède pas de récepteur  $ET_B$  tandis que les poumons en sont très riches. Suite à cette réflexion, nous nous serions attendu à ce que l'augmentation de la vasoconstriction observée dans les artères arquées utérines de rates gestantes ainsi que son profil pharmacologique (contraction à la S6c) soient corrélée par une augmentation de l'expression des récepteurs  $ET_B$ . En effet, la contraction dépendante de ce récepteur apparaît pendant la grossesse et il a été démontré que l'activité mitotique, abondamment présente lors

de cet état, induirait une permutation dans les sous-types de récepteurs de l'ET favorisant le type B <sup>82</sup>.

La régulation de l'expression des récepteurs de l'endothéline obéit à plusieurs stimuli variés. Il est connu que le facteur de croissance épidermique (EGF), l'adénosine monophosphate cyclique (AMP<sub>c</sub>) et les œstrogènes augmentent l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> tandis que les endothélines 1, 2 et 3, l'angiotensine II (Ang II) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) l'inhibe. Quant à l'expression du récepteur ET<sub>B</sub>, elle est augmentée en réponse au peptide natriurétique de type C, l'Ang II et le facteur de croissance fibroblastique (FGF). Cependant, l'AMP<sub>c</sub> et les catécholamines inhibent l'expression de ce dernier <sup>68</sup>. Ces médiateurs agissent sur l'expression des récepteurs de l'endothéline dans le but d'assurer l'homéostasie et un fonctionnement harmonieux du corps humain. Ainsi, il arrive que, pour des raisons physiologiques, il soit nécessaire de mettre en marche une cascade de médiateurs induisant le remodelage de ce système dans divers tissus. La grossesse est sans doute l'un de ces états nécessitant le remodelage le plus spectaculaire. En effet, plusieurs des stimuli favorisant l'expression des récepteurs de l'endothéline sont augmentés lors de la gestation. Les quantités d'œstrogènes, par exemple, augmentent de plusieurs ordres de grandeur jusqu'à la parturition <sup>131</sup> et induisent une synthèse accrue de récepteurs ET<sub>A</sub> dans divers tissus. Également, des chercheurs ont observé une augmentation des récepteurs liant l'ET dans l'utérus de lapin suite à un traitement aux œstrogènes <sup>95</sup>. Dans le même sens, les concentrations d'ARN<sub>m</sub> des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> <sup>132</sup> ainsi que de la prepro-ET <sup>133</sup> changent tout au long du cycle menstruel dans l'endomètre humain en réponse aux stéroïdes sexuels. La grossesse est aussi accompagnée d'une augmentation importante d'Ang II <sup>96</sup> connu pour ses effets bénéfiques sur la synthèse de récepteurs ET<sub>B</sub>.



De plus en plus d'éléments poussent les chercheurs à croire que le système ET/ETR est primordial pendant la gestation. En effet, l'endothéline est un important stimulus pour induire l'activité mitotique, l'hypertrophie et la différenciation cellulaire <sup>80, 81</sup> nécessaire à l'implantation et au développement fœtal.

Il a été démontré par réaction de polymérase en chaîne précédée d'une transcription inverse (RT-PCR) que pendant le premier trimestre, le placenta exprime les gènes codant pour la prépro-ET-1, -ET-2 et -ET-3. On croit même que l'ET pourrait être à l'origine des vaisseaux spiralés puisque les feuillets embryonnaires d'où ceux-ci originent expriment aussi ces gènes. Ainsi, il n'est pas exclu que l'ET pourrait jouer un rôle dans le développement du placenta et d'autres organes fœtaux pendant l'embryogénèse <sup>134</sup>. L'endothéline serait aussi l'une des molécules ayant une influence positive sur la migration des cellules trophoblastiques <sup>135</sup>. En effet, l'endothéline est exprimé dans les vaisseaux sanguins placentaires, les cellules syncytiotrophoblastiques et trophoblastiques; et les récepteurs ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> dans les cellules trophoblastiques <sup>135, 136</sup>. La migration des cellules trophoblastiques dépendrait en partie de l'augmentation intracellulaire de calcium, de phospholipase C, d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et des MAP kinases induites par l'ET via les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> <sup>135</sup>.

Nous savons depuis longtemps que la déficience en endothéline et en récepteurs ET<sub>A</sub> cause de sévères malformations craniofaciales. C'est pourquoi, les antagonistes des récepteurs de l'endothéline comme le Bosentan sont fortement tératogène et nécessite un suivi étroit des femmes en âge de procréer qui en consomment. En effet, des études d'hybridation *in-situ* ont confirmé l'importance de la présence des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans les cellules impliqués dans l'ostéogénèse de la mandibule. Chez l'humain, l'ET pourrait jouer un rôle dans l'interaction épithélium-mésenchyme pendant la morphogénèse craniofaciale <sup>137</sup>. Également, des observations indiquent que l'ET possède un rôle capital dans la différenciation et le développement des cellules dérivées de la crête neurale embryonnaire <sup>138</sup>. Un défaut dans le gène codant pour le récepteur ET<sub>B</sub> cause, quant à lui, des désordres pigmentaires et un échec

de la migration des cellules neurales vers le colon pendant l'embryogénèse. Cette absence de plexus nerveux engendre un colon atone et peut résulter en d'importantes obstructions dans les premiers jours suivant la naissance <sup>139, 140</sup>. ET-1 et le récepteur ET<sub>A</sub> seraient aussi essentiel dans les premières minutes de la vie lors de la constriction du *ductus arteriosus* fœtal <sup>141</sup>.

La croissance fœtale ne serait pas un succès si l'apport en oxygène et en nutriments n'était pas adéquat. Ainsi, la régulation de la circulation fœto-maternelle est primordiale et le système ET/ETR semble en être un joueur important. Dans plusieurs tissus, la résistance vasculaire est contrôlée par le ratio ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> et c'est l'un des éléments que nous avons tenté de vérifier dans notre étude. Sachant que les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> étaient présent dans la vasculature fœtoplacentaire <sup>97, 98</sup>, nous avons démontré que l'ET avait un effet sur les artères utérines et que sa réponse augmentait lors de la grossesse. Cependant, nous n'avons pas réussi à corréler l'augmentation de la réponse à l'endothéline avec un accroissement de la synthèse de l'un ou l'autre des récepteurs dans les cellules musculaires lisses des artères utérines. Néanmoins, nous avons constaté une augmentation de la synthèse de récepteurs ET<sub>B</sub> dans l'endothélium cohérente avec ce que d'autres équipes ont observé dans le placenta pendant la grossesse. En effet, les vaisseaux placentaires humains présenteraient une prédominance de récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux démontrant l'importance de la dilatation et du maintien de la circulation fœtoplacentaire pendant la gestation <sup>100</sup>. Paradoxalement, des études *in vitro* ont démontré que l'ET-1 pouvait contracter ces mêmes artères placentaires isolées via l'activation des deux récepteurs à la fois <sup>142</sup> démontrant bien toute la complexité du système ET/ETR.

Les endothélines et leurs récepteurs forment donc un système régulateur distribué dans plusieurs organes et exerçant des effets physiologiques essentiels. Les endothélines agissent comme facteurs de croissance et sont impliquées dans le succès de la grossesse et du développement fœtal. Cependant, de plus en plus d'informations semblent démontrer que

celles-ci possèdent aussi un rôle pathophysiologique important, particulièrement dans le système vasculaire.

La prééclampsie est une maladie spécifique à l'être humain et affecte environ 4-5% des grossesses. Elle est la première cause de mortalité et morbidité maternelle et néonatale dans les pays occidentaux. Cette maladie est caractérisée par une hypertension artérielle gravidique (systolique supérieure à 140 mm de Hg et/ou diastolique supérieure à 90 mm de Hg) associée à une protéinurie supérieure à 300 mg par jour. Les chercheurs croient qu'une anomalie initiale dans l'invasion des artères spiralées utérines lors de la placentation serait à l'origine de la pathophysiologie de la prééclampsie <sup>143</sup>. En effet, ces artères n'atteindraient pas un calibre suffisant pour perfuser correctement le placenta. L'ischémie/hypoxie placentaire provoquerait une dysfonction endothéliale causant un déséquilibre entre les facteurs relaxants et constricteurs dérivés de l'endothélium contribuant à l'hypertension présente lors de cette maladie <sup>144</sup>. Plus précisément, elle résulterait en une augmentation de la formation d'ET, de  $\text{TXA}_2$  et de superoxyde et augmenterait la sensibilité vasculaire à l'Ang II conjointement à une diminution de la formation de vasodilatateurs comme le NO et la  $\text{PGI}_2$  <sup>36</sup>. Effectivement, l'ET serait un des facteurs importants puisque l'on a observé une augmentation impressionnante de sa concentration à la fois dans la circulation périphérique et utérine chez les femmes souffrant de prééclampsie par rapport aux femmes ayant une grossesse normale. Il a même été suggéré que le niveau d'accroissement d'ET plasmatique représenterait l'envergure des dommages endothéliaux et/ou serait relié à la sévérité de la maladie <sup>145</sup>. De plus, des études ont démontré que la forte concentration d'ET-1 circulante lors de la prééclampsie diminuerait l'expression des récepteurs  $\text{ET}_A$  probablement par l'intermédiaire de l'internalisation des récepteurs <sup>146, 147</sup>. Cette dernière observation pourrait expliquer la diminution des effets de l'ET dans les artères utéro-placentaires observée chez les femmes souffrants de cette maladie <sup>148</sup>.

Fréquemment, la restriction de croissance intra-utérine chez le fœtus est associée à la prééclampsie. Les défauts dans la placentation commencent au tout début de la gestation et

engendre éventuellement une détérioration de la fonction placentaire à partir du moment où les besoins du fœtus surpassent la capacité du placenta. Ainsi, le placenta défectueux devient d'autant plus compromis par la diminution de sa perfusion suite à une synthèse accrue de substances vasoactives <sup>149</sup>. En effet, l'augmentation de la résistance vasculaire engendrée par la synthèse augmentée de vasoconstricteurs provoque une diminution du flot sanguin notamment dans l'artère ombilicale <sup>101, 150, 151</sup>. De plus, l'augmentation des forces de cisaillement <sup>152</sup> ainsi que l'ischémie/hypoxie <sup>153, 154</sup> causée par la constriction des vaisseaux ombilicaux sont de puissants activateurs de la synthèse d'ET impliquant le système ET/ETR dans la situation. En effet, l'expression de l'ET-1 dans le placenta et le liquide amniotique est fortement augmentée dans les grossesses compliquées de restriction de croissance intra-utérine <sup>155, 156</sup>. Le fœtus ne reçoit donc pas assez de nutriments et d'oxygène, ce qui provoque une souffrance fœtale chronique avec un retard de croissance intra-utérin.

Il est donc primordial pour la santé de la mère et de l'enfant de connaître et de comprendre le remodelage survenant pendant la grossesse afin de pouvoir discerner cette fine ligne départageant le remodelage physiologique du remodelage pathologique. La régulation du système ET/ETR est complexe et finement orchestrée à différents niveaux par d'innombrables médiateurs. Une meilleure connaissance de ceux-ci et une meilleure compréhension de leurs interactions permettra davantage de contrôler les actions physiologiques de l'endothéline, notamment dans la grossesse et le développement fœtal, et d'en prévenir les dérèglements.

La prochaine étape de ce projet consistera donc à caractériser le remodelage vasculaire utérin survenant pendant la grossesse. Chez la rate en fin de gestation, le diamètre de l'artère utérine double, permettant un accroissement du débit sanguin de vingt fois (débit proportionnel au rayon puissance 4), dans le but de répondre aux besoins du fœtus. Ce remodelage vasculaire a été démontré étant, à la fois, de type hypertrophique et hyperplasique. Nous voulons donc tenter de suivre ce remodelage en dosant les marqueurs pro- et anti-

apoptotique (Bax/Bcl-2), les taux d'apoptose cellulaire (TUNEL) et l'augmentation de la synthèse d'ADN (thymidine tritiée) à différents moments de la grossesse. De plus, il serait intéressant d'observer les effets de l'abolissement de ce remodelage. Malheureusement, l'utilisation de rates invalidées pour les gènes des récepteurs de l'endothéline et de bloqueurs ne semble pas être une option en raison de la mortalité chez les foetus<sup>138, 140</sup>. Une autre possibilité consisterait en l'élaboration d'une surexpression des gènes des récepteurs. Cette technique permettrait d'amplifier les effets que nous attribuons à chacun des récepteurs. Par exemple, une surexpression du gène de l'ET<sub>B</sub> pourrait permettre de démontrer la prédominance de ce type de récepteur lors de la gestation si elle arrive à accentuer les différences d'ampleur de contraction déjà observées par rapport à l'état non gestationnel. Dans le même ordre d'idée, une surexpression de ce même récepteur (ET<sub>B</sub>) chez la rate non gestante produirait des réponses similaires à celles observées chez la gestante. Il serait également pertinent d'évaluer les retombées d'un blocage des médiateurs post-récepteur (PLC, PLA<sub>2</sub>, DAG, IP<sub>3</sub>, PKC, Ca<sup>2+</sup>, ...) impliqués dans la contraction induite par l'endothéline. Cependant, les observations que nous pourrions être en mesure de constater risquent de ne pas être spécifiques à l'endothéline, mais commune à d'autres composés comme Ang II.

#### 4. BIBLIOGRAPHIE

1. Moutquin, J.M. *et al.* [Prospective study of arterial pressure during pregnancy. Prediction of hypertensive complications]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* **11**, 833-837 (1982).
2. Tortora, G.J. & Grabowski, S.R. *Principes d'anatomie et de physiologie* (Éditions du renouveau pédagogique inc., 2001).
3. Gabbe, S.G., Neibyl, J.R., & Simpson, J.L. *Obstetrics: Normal and problem pregnancies* (Churchill Livingstone, Philadelphia, 2001).
4. Chiasson, R.B. *Laboratory anatomy of the white rat* (W.M. C. Brown company publishers, Dubuque, Iowa, 1958).
5. Schiffrin, E.L. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* **43**, 19-29 (2005).
6. Haynes, W.G. & Webb, D.J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* **16**, 1081-1098 (1998).
7. Motte, S., McEntee, K., & Naeije, R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol. Ther.* **110**, 386-414 (2006).
8. Warner, T.D. & Mitchell, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **18**, 790-804 (2004).
9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, & Moore PK Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs in *Pharmacology* 244-261 (2003).

10. Torgersen, K.L. & Curran, C.A. A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs. Q.* **29**, 2-19 (2006).
11. Barron, W.M. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am. J. Kidney Dis.* **9**, 296-302 (1987).
12. Roy-Clavel, E., Picard, S., St-Louis, J., & Brochu, M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 608-613 (1999).
13. Cox, B.E., Word, R.A., & Rosenfeld, C.R. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 49-58 (1996).
14. Malassine P & Benhamou D Adaptation cardiovasculaire maternelle à la grossesse (eds. Papiernik E, Cabrol D & Pons JC) 125-130 Paris, 1995).
15. Descamps, P., Marret, H., Binelli, C., Chaplot, S., & Gillard, P. [Body changes during pregnancy]. *Neurochirurgie* **46**, 68-75 (2000).
16. Longo, L.D. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am. J. Physiol.* **245**, R720-R729 (1983).
17. Lund, C.J. & Donovan, J.C. Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **98**, 394-403 (1967).
18. Bard, H., Rosenberg, A., & Huisman, T.H. Hemoglobinopathies affecting maternal-fetal oxygen gradient during pregnancy: molecular, biochemical and clinical studies. *Am. J. Perinatol.* **15**, 389-393 (1998).
19. Duvekot, J.J. & Peeters, L.L. Maternal cardiovascular hemodynamic adaptation to pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* **49**, S1-14 (1994).
20. Blanc B, Comte M, & Boubli L Les constantes biologiques au cours de la grossesse in *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 1-24 1998).

21. Monga M & Creazy RK Cardiovascular and renal adaptation to pregnancy in *Maternal-fetal medicine: principles and practice* (ed. WB Saunders) 758-763 Philadelphia, PA, 1994).
22. Ueland,K. & Metcalfe,J. Heart disease in pregnancy. *Clin. Perinatol.* **1**, 349-367 (1974).
23. Ahokas,R.A., Anderson,G.D., & Lipshitz,J. Cardiac output and uteroplacental blood flow diet-restricted and diet-repleted pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **146**, 6-13 (1983).
24. St-Louis,J. & Massicotte,G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **37**, 1351-1357 (1985).
25. MacGillivray,I., Rose,G.A., & Rowe,B. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin. Sci.* **37**, 395-407 (1969).
26. Wilson,M. *et al* Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med* **68**, 97-104 (1980).
27. Hatjis,C.G., Kofinas,A.D., Greelish,J.P., Swain,M., & Rose,J.C. Interrelationship between atrial natriuretic factor concentrations and acute volume expansion in pregnant and nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 45-50 (1990).
28. Cipolla,M. & Osol,G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171**, 805-811 (1994).
29. St-Louis,J., Pare,H., Sicotte,B., & Brochu,M. Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am. J. Physiol* **273**, H1148-H1153 (1997).
30. Page,K.L., Celia,G., Leddy,G., Taatjes,D.J., & Osol,G. Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **187**, 1647-1652 (2002).



31. SSALI,N.S., RAURAMO,L., & PELTONEN,T. Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. VIII. Uterine and fetal blood flow and oxygen consumption in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **79**, 86-98 (1960).
32. St-Louis,J., Massicotte,G., & Parent,A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse: Influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Science* **6**, 358-365 (1988).
33. Duncan,S.L. The partition of uterine blood flow in the pregnant rabbit. *J. Physiol* **204**, 421-433 (1969).
34. WIGGLESWORTH,J.S. EXPERIMENTAL GROWTH RETARDATION IN THE FOETAL RAT. *J. Pathol. Bacteriol.* **88**, 1-13 (1964).
35. Resnik R & Creasy RK Intrauterine Growth Restriction in *Maternal-fetal medicine: principles and practice* (ed. WB Saunders) 495-512 Philadelphia, 2005).
36. Granger,J.P., Alexander,B.T., Llinas,M.T., Bennett,W.A., & Khalil,R.A. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation.* **9**, 147-160 (2002).
37. Crews,J.K., Herrington,J.N., Granger,J.P., & Khalil,R.A. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension* **35**, 367-372 (2000).
38. DiFederico,E., Genbacev,O., & Fisher,S.J. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am. J. Pathol.* **155**, 293-301 (1999).
39. Zhou,Y., Damsky,C.H., Chiu,K., Roberts,J.M., & Fisher,S.J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest* **91**, 950-960 (1993).
40. Yanagisawa,M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415 (1988).

41. Inoue, A. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 2863-2867 (1989).
42. Blais, V. *et al.* Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* **524**, 43-48 (2002).
43. Kido, T. *et al.* Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *Eur. J. Biochem.* **244**, 520-526 (1997).
44. Masaki, T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc. Res.* **39**, 530-533 (1998).
45. Rubanyi, G.M. & Polokoff, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**, 325-415 (1994).
46. Emoto, N. & Yanagisawa, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* **270**, 15262-15268 (1995).
47. Hasegawa, H. *et al.* Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* **428**, 304-308 (1998).
48. Haynes, W.G. & Webb, D.J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* **344**, 852-854 (1994).
49. WEIBEL, E.R. & PALADE, G.E. NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *J. Cell Biol.* **23**, 101-112 (1964).
50. Russell, F.D., Skepper, J.N., & Davenport, A.P. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ. Res.* **83**, 314-321 (1998).
51. Russell, F.D., Skepper, J.N., & Davenport, A.P. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**, 424-430 (1998).

52. Fyhrquist, F. *et al.* Raised plasma endothelin-I concentration following cold pressor test. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 217-221 (1990).
53. Wagner, O.F. *et al.* Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 16066-16068 (1992).
54. Eljovich, F., Laffer, C.L., Schiffrin, E.L., Gavras, H., & Amador, E. Endothelin-aldosterone interaction and proteinuria in low-renin hypertension. *J. Hypertens.* **22**, 573-582 (2004).
55. Olson, G.L., Saade, G.R., Buhimschi, I., Chwalisz, K., & Garfield, R.E. The effect of an endothelin antagonist on blood pressure in a rat model of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181**, 638-641 (1999).
56. Stewart, D.J., Levy, R.D., Cernacek, P., & Langleben, D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann. Intern. Med.* **114**, 464-469 (1991).
57. Brooks, D.P., Contino, L.C., Storer, B., & Ohlstein, E.H. Increased endothelin excretion in rats with renal failure induced by partial nephrectomy. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 987-989 (1991).
58. Bruzzi, I. *et al.* Time course and localization of endothelin-1 gene expression in a model of renal disease progression. *Am. J. Pathol.* **151**, 1241-1247 (1997).
59. Sirvio, M.L., Metsarinne, K., Saijonmaa, O., & Fyhrquist, F. Tissue distribution and half-life of <sup>125</sup>I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 1191-1195 (1990).
60. Vierhapper, H., Wagner, O., Nowotny, P., & Waldhausl, W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* **81**, 1415-1418 (1990).
61. Anggard, E. *et al.* The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**, S46-S49 (1989).

62. Dupuis,J., Goresky,C.A., & Fournier,A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J. Appl. Physiol* **81**, 1510-1515 (1996).
63. Dupuis,J., Stewart,D.J., Cernacek,P., & Gosselin,G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* **94**, 1578-1584 (1996).
64. Waeber,C., Hoyer,D., & Palacios,J.M. Similar distribution of [125I]sarafotoxin-6b and [125I]endothelin-1, -2, -3 binding sites in the human kidney. *Eur. J. Pharmacol.* **176**, 233-236 (1990).
65. Maguire,J.J. & Davenport,A.P. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 191-197 (1995).
66. Matsumoto,H., Suzuki,N., Kitada,C., & Fujino,M. Endothelin family peptides in human plasma and urine: their molecular forms and concentrations. *Peptides* **15**, 505-510 (1994).
67. Arai,H., Hori,S., Aramori,I., Ohkubo,H., & Nakanishi,S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730-732 (1990).
68. Levin,E.R. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**, 356-363 (1995).
69. Davenport,A.P. & Battistini,B. Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development. *Clin. Sci. (Lond)* **103 Suppl 48**, 1S-3S (2002).
70. Goto,K. & Warner,T.D. Molecular pharmacology. Endothelin versatility. *Nature* **375**, 539-540 (1995).
71. Webb,D.J., Monge,J.C., Rabelink,T.J., & Yanagisawa,M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 5-8 (1998).

72. Warner, T.D., de, N.G., & Vane, J.R. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **159**, 325-326 (1989).
73. Douglas, S.A., Beck, G.R., Jr., Elliott, J.D., & Ohlstein, E.H. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 1529-1540 (1995).
74. Calo, G., Gratton, J.P., Telemaque, S., Orleans-Juste, P., & Regoli, D. Pharmacology of endothelins: vascular preparations for studying ETA and ETB receptors. *Mol. Cell Biochem.* **154**, 31-37 (1996).
75. Mickley, E.J., Gray, G.A., & Webb, D.J. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1376-1382 (1997).
76. Mizuguchi, T. *et al.* Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1427-1430 (1997).
77. Flynn, M.A., Haleen, S.J., Welch, K.M., Cheng, X.M., & Reynolds, E.E. Endothelin B receptors on human endothelial and smooth-muscle cells show equivalent binding pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 106-116 (1998).
78. Karne, S., Jayawickreme, C.K., & Lerner, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268**, 19126-19133 (1993).
79. Clerk, A. *et al.* Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem. J.* **368**, 101-110 (2002).
80. Komuro, I. *et al.* Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **238**, 249-252 (1988).
81. Zamora, M.A., Dempsey, E.C., Walchak, S.J., & Stelzner, T.J. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human

- pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 429-433 (1993).
82. Eguchi, S., Hirata, Y., Imai, T., Kanno, K., & Marumo, F. Phenotypic change of endothelin receptor subtype in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **134**, 222-228 (1994).
  83. Williams, D.L., Jr., Jones, K.L., Pettibone, D.J., Lis, E.V., & Clineschmidt, B.V. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 556-561 (1991).
  84. Russell, F.D. & Davenport, A.P. Characterization of the binding of endothelin ETB selective ligands in human and rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 631-636 (1996).
  85. Flynn, D.A., Sargent, C.A., Brazdil, R., Brown, T.J., & Roach, A.G. Sarafotoxin S6c elicits a non-ETA or non-ETB-mediated pressor response in the pithed rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S219-S221 (1995).
  86. Shraga-Levine, Z., Galron, R., & Sokolovsky, M. Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. *Biochemistry* **33**, 14656-14659 (1994).
  87. Ihara, M. *et al.* In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20 Suppl 12**, S11-S14 (1992).
  88. Ishikawa, K. *et al.* Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4892-4896 (1994).
  89. Karaki, H., Sudjarwo, S.A., & Hori, M. Novel antagonist of endothelin ETB1 and ETB2 receptors, BQ-788: effects on blood vessel and small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 168-173 (1994).

90. Clozel, M. *et al.* Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 228-235 (1994).
91. Krum, H., Viskoper, R.J., Lacourciere, Y., Budde, M., & Charlon, V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N. Engl. J. Med.* **338**, 784-790 (1998).
92. Teerlink, J.R. *et al.* Role of endothelin in the maintenance of blood pressure in conscious rats with chronic heart failure. Acute effects of the endothelin receptor antagonist Ro 47-0203 (bosentan). *Circulation* **90**, 2510-2518 (1994).
93. Benigni, A. & Remuzzi, G. Endothelin antagonists. *Lancet* **353**, 133-138 (1999).
94. Davenport, A.P. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **54**, 219-226 (2002).
95. Maggi, M. *et al.* Immunolocalization, binding, and biological activity of endothelin in rabbit uterus: effect of ovarian steroids. *Am. J. Physiol* **260**, E292-E305 (1991).
96. Hagemann, A., Nielsen, A.H., & Poulsen, K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**, 252-261 (1994).
97. Hemsén, A., Gillis, C., Larsson, O., Haegerstrand, A., & Lundberg, J.M. Characterization, localization and actions of endothelins in umbilical vessels and placenta of man. *Acta Physiol Scand.* **143**, 395-404 (1991).
98. Robaut, C., Mondon, F., Bandet, J., Ferre, F., & Caverio, I. Regional distribution and pharmacological characterization of [<sup>125</sup>I]endothelin-1 binding sites in human fetal placental vessels. *Placenta* **12**, 55-67 (1991).
99. Bourgeois, C. *et al.* Endothelin-1 and ETA receptor expression in vascular smooth muscle cells from human placenta: a new ETA receptor messenger ribonucleic acid is generated by alternative splicing of exon 3. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 3116-3123 (1997).

100. Kilpatrick,S.J., Roberts,J.M., Lykins,D.L., & Taylor,R.N. Characterization and ontogeny of endothelin receptors in human placenta. *Am. J. Physiol* **264**, E367-E372 (1993).
101. Lombardi,S.J., Rosemond,R., Ball,R., Entman,S.S., & Boehm,F.H. Umbilical artery velocimetry as a predictor of adverse outcome in pregnancies complicated by oligohydramnios. *Obstet. Gynecol.* **74**, 338-341 (1989).
102. Tyrrell,S., Obaid,A.H., & Lilford,R.J. Umbilical artery Doppler velocimetry as a predictor of fetal hypoxia and acidosis at birth. *Obstet. Gynecol.* **74**, 332-337 (1989).
103. Fok,R.Y., Pavlova,Z., Benirschke,K., Paul,R.H., & Platt,L.D. The correlation of arterial lesions with umbilical artery Doppler velocimetry in the placentas of small-for-dates pregnancies. *Obstet. Gynecol.* **75**, 578-583 (1990).
104. Nordenvall,M. *et al.* Placental morphology in relation to umbilical artery blood velocity waveforms. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **40**, 179-190 (1991).
105. Clark,B.A., Halvorson,L., Sachs,B., & Epstein,F.H. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166**, 962-968 (1992).
106. Dekker,G.A., Kraayenbrink,A.A., Zeeman,G.G., & van Kamp,G.J. Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **40**, 215-220 (1991).
107. Nova,A., Sibai,B.M., Barton,J.R., Mercer,B.M., & Mitchell,M.D. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165**, 724-727 (1991).
108. Taylor,R.N., Varma,M., Teng,N.N., & Roberts,J.M. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **71**, 1675-1677 (1990).
109. Yang,Z.H. *et al.* Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation* **82**, 188-195 (1990).



110. Consigny, P.M. Endothelin-1 increases arterial sensitivity to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* **186**, 239-245 (1990).
111. Wolff, K., Faxen, M., Lunell, N.O., Nisell, H., & Lindblom, B. Endothelin receptor type A and B gene expression in human nonpregnant, term pregnant, and preeclamptic uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**, 1295-1300 (1996).
112. Hyslop, S. & de, N.G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.* **26**, 223-242 (1992).
113. Randall, M.D. Vascular activities of the endothelins. *Pharmacol. Ther.* **50**, 73-93 (1991).
114. Armstead, W.M., Mirro, R., Leffler, C.W., & Busija, D.W. Influence of endothelin on piglet cerebral microcirculation. *Am. J. Physiol.* **257**, H707-H710 (1989).
115. Huggins, J.P., Pelton, J.T., & Miller, R.C. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacol. Ther.* **59**, 55-123 (1993).
116. Vane, J.R., Bakhle, Y.S., & Botting, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 97-120 (1998).
117. Subbaramaiah, K., Lin, D.T., Hart, J.C., & Dannenberg, A.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J. Biol. Chem.* **276**, 12440-12448 (2001).
118. Yang, W.L. & Frucht, H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* **22**, 1379-1383 (2001).
119. Sheng, H., Shao, J., & DuBois, R.N. K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res.* **61**, 2670-2675 (2001).

120. Sheng,H. *et al.* Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 6628-6635 (2000).
121. Mitchell,J.A. & Warner,T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 1121-1132 (1999).
122. Hawkey,C.J. COX-2 inhibitors. *Lancet* **353**, 307-314 (1999).
123. Rainsford,K.D. Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen. *Int. J. Clin. Pract. Suppl* **3-8** (2003).
124. DeWitt,D.L. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharmacol.* **55**, 625-631 (1999).
125. Kniss,D.A. Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **6**, 285-292 (1999).
126. Pall,M., Friden,B.E., & Brannstrom,M. Induction of delayed follicular rupture in the human by the selective COX-2 inhibitor rofecoxib: a randomized double-blind study. *Hum. Reprod.* **16**, 1323-1328 (2001).
127. Gross,G.A. *et al.* Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11875-11879 (1998).
128. Janowiak,M.A., Magness,R.R., Habermehl,D.A., & Bird,I.M. Pregnancy increases ovine uterine artery endothelial cyclooxygenase-1 expression. *Endocrinology* **139**, 765-771 (1998).
129. Slater,D., Berger,L., Newton,R., Moore,G., & Bennett,P. The relative abundance of type 1 to type 2 cyclo-oxygenase mRNA in human amnion at term. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 304-308 (1994).
130. Kniss,D.A., Zimmerman PD, Gabbe SG, & Iams JD. Selective ablation of cyclooxygenase-2 gene expression and prostaglandin biosynthesis by antisense

phosphorothioates. *J. Soc. Gynecol. Investig.* [3 (Suppl)], 95A. 1996.  
Ref Type: Abstract

131. Johnson, M.H. & Everitt, B.J. Reconnaissance maternelle et soutien de la gestation in *Reproduction* (ed. DeBoeck Université) 191-199 (2007).
132. O'Reilly, G., Charnock-Jones, D.S., Davenport, A.P., Cameron, I.T., & Smith, S.K. Presence of messenger ribonucleic acid for endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in human endometrium and a change in the ratio of ETA and ETB receptor subtype across the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **75**, 1545-1549 (1992).
133. Economos, K., MacDonald, P.C., & Casey, M.L. Endothelin-1 gene expression and biosynthesis in human endometrial HEC-1A cancer cells. *Cancer Res.* **52**, 554-557 (1992).
134. Jauniaux, E., Mignot, T.M., Rebourcet, R., Robert, B., & Ferre, F. Placental endothelin gene expression and endothelin concentration in fetal fluids of the first trimester gestational sac. *Mol. Hum. Reprod.* **6**, 758-762 (2000).
135. Chakraborty, C. *et al.* Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. *Mol. Cell Endocrinol.* **201**, 63-73 (2003).
136. Cervar, M. *et al.* Endothelin A and B receptors change their expression levels during development of human placental villi. *Placenta* **21**, 536-546 (2000).
137. Barni, T. *et al.* Role of endothelin in the human craniofacial morphogenesis. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **18**, 183-194 (1998).
138. Clouthier, D.E. *et al.* Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125**, 813-824 (1998).
139. Baynash, A.G. *et al.* Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**, 1277-1285 (1994).

140. Hosoda,K. *et al.* Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267-1276 (1994).
141. Momma,K., Nakanishi,T., & Imamura,S. Inhibition of in vivo constriction of fetal ductus arteriosus by endothelin receptor blockade in rats. *Pediatr. Res.* **53**, 479-485 (2003).
142. Sand,A.E., Ostlund,E., Andersson,E., & Fried,G. Endothelin-induced contractions in placental arteries is mediated by both ETA- and ETB-receptors. *Acta Physiol Scand.* **163**, 227-234 (1998).
143. Brosens,J.J., Pijnenborg,R., & Brosens,I.A. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **187**, 1416-1423 (2002).
144. Leszczynska-Gorzelak,B., Kaminski,K., Szymula,D., Sawulicka-Oleszczuk,H., & Oleszczuk,J. Serum level of endothelin-1 and -2 in pregnancies complicated by EPH gestosis. *Gynecol. Obstet. Invest* **43**, 37-40 (1997).
145. Bussen,S., Sutterlin,M., & Steck,T. Plasma endothelin and big endothelin levels in women with severe preeclampsia or HELLP-syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* **262**, 113-119 (1999).
146. Nisell,H. *et al.* Endothelin, a vasoconstrictor important to the uteroplacental circulation in pre-eclampsia. *J. Hypertens. Suppl* **9**, S168-S169 (1991).
147. Wolff,K. *et al.* Endothelin-1 and big endothelin-1 levels in normal term pregnancy and in preeclampsia. *Regul. Pept.* **67**, 211-216 (1996).
148. Wolff,K. *et al.* Effects of endothelin-1 and the ETA receptor antagonist BQ-123 on resistance arteries from normal pregnant and preeclamptic women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **75**, 432-438 (1996).
149. Thaete,L.G., Dewey,E.R., & Neerhof,M.G. Endothelin and the regulation of uterine and placental perfusion in hypoxia-induced fetal growth restriction. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **11**, 16-21 (2004).

150. McQueen,J., Kingdom,J.C., Connell,J.M., & Whittle,M.J. Fetal endothelin levels and placental vascular endothelin receptors in intrauterine growth retardation. *Obstet. Gynecol.* **82**, 992-998 (1993).
151. Nicolini,U. *et al.* Limited role of fetal blood sampling in prediction of outcome in intrauterine growth retardation. *Lancet* **336**, 768-772 (1990).
152. Milner,P., Bodin,P., Loesch,A., & Burnstock,G. Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 649-656 (1990).
153. Hashiguchi,K. *et al.* Relationship between fetal hypoxia and endothelin-1 in fetal circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 Suppl 7**, S509-S510 (1991).
154. Rakugi,H. *et al.* Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 973-977 (1990).
155. Di Iorio R. *et al.* Amniotic fluid endothelin-1 levels are increased in pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth retardation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **36**, 260-263 (1996).
156. Faxen,M., Nasiell,J., Lunell,N.O., & Blanck,A. Differences in mRNA expression of endothelin-1, c-fos and c-jun in placentas from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. *Gynecol. Obstet. Invest* **44**, 93-96 (1997).